



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**

BRIANA RACHID DIAS VIEIRA

**O TECIDO ADIPOSEO MARROM E O HIPOTÁLAMO SÃO REGULADOS DE
FORMA INDEPENDENTE EM RESPOSTA AO FRIO EM HUMANOS OBESOS**

***DISTINCT REGULATION OF HYPOTHALAMIC AND BROWN ADIPOSE TISSUE
ACTIVITIES IN RESPOSE TO COLD IN OBESE SUBJECTS***

CAMPINAS

2015

BRIANA RACHID DIAS VIEIRA

**O TECIDO ADIPOSEO MARROM E O HIPOTÁLAMO SÃO REGULADOS DE
FORMA INDEPENDENTE EM RESPOSTA AO FRIO EM HUMANOS OBESOS**

***DISTINCT REGULATION OF HYPOTHALAMIC AND BROWN ADIPOSE TISSUE
ACTIVITIES IN RESPOSE TO COLD IN OBESE SUBJECTS***

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Lício Augusto Velloso

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
BRIANA RACHID DIAS VIEIRA, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO

CAMPINAS

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FUNCAMP, 02P-27740/2011

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

V673t Vieira, Briana Rachid Dias, 1981-
O tecido adiposo marrom e o hipotálamo são regulados de forma independente em resposta ao frio em humanos obesos / Briana Rachid Dias Vieira. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Licio Augusto Velloso.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Tecido adiposo marrom. 2. Obesidade. 3. Hipotálamo. I. Velloso, Licio Augusto, 1963-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Distinct regulation of hypothalamus and brown adipose tissue activities in response to cold in obese subjects

Palavras-chave em inglês:

Brown adipose tissue

Obesity

Hypothalamic

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Licio Augusto Velloso [Orientador]

Marcos Antonio Tambascia

Andrei Carvalho Sposito

Maria Teresa Zanella

João Eduardo Nunes Salles

Data de defesa: 23-10-2015

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

BRIANA RACHID DIAS VIEIRA

ORIENTADOR: LICIO AUGUSTO VELLOSO

MEMBROS:

1. PROF. DR. LICIO AUGUSTO VELLOSO

2. PROF. DR. MARCOS ANTONIO TAMBASCIA

3. PROF. DR. ANDREI CARVALHO SPOSITO

4. PROFA. DRA. MARIA TERESA ZANELLA

5. PROF. DR. JOÃO EDUARDO NUNES SALLES

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 23/10/2015

*A Deus, que permitiu que
a minha Fé me conduzisse*

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos à conclusão desta tese ao **Professor Lício Velloso**, à quem a genialidade, influência e humildade permitiram que esse trabalho fosse idealizado;

Aos meus pais **Lucia, Vitor e avó Antonieta**, que me ensinaram conceitos de disciplina e valores;

Ao meu marido **Guilherme**, pela paciência, que lhe é tão característica, e incentivo;

Ao meu pequeno filho **Felipe**, a quem espero ser exemplo no seu futuro;

Mas, meu agradecimento especial, à minha irmã **Bianca**, que de forma silenciosa, me espelhou em todos os meus passos profissionais, desde a escolha pela medicina como pela pesquisa

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo e ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo financiamento.

À Universidade Estadual de Campinas, pela infraestrutura e pela contribuição na minha formação.

Obesidade é uma das doenças de maior prevalência no planeta devendo alcançar níveis de 30% da população mundial nos próximos 10 anos. Não existem abordagens terapêuticas eficientes para prevenir ou reverter o quadro de obesidade de tal forma que há, no momento, intensa busca por alvos terapêuticos eficazes. O hipotálamo é a região do sistema nervoso central encarregado de controlar a fome e o gasto energético. Estudos desenvolvidos na última década demonstraram que durante o desenvolvimento da obesidade ocorre uma progressiva deterioração da atividade hipotalâmica resultando em uma perda progressiva da resposta a substâncias anorexígenas e pró-termogênicas. O tecido adiposo marrom é um dos potenciais alvos da ação pró-termogênica do hipotálamo através de substâncias como leptina, insulina, adiponectina, neuropeptídeo Y e GLP-1. Em modelos animais, o hipotálamo controla a atividade do tecido adiposo marrom por meio de conexões simpáticas. Entretanto, em seres humanos existem controvérsias a respeito da existência e da funcionalidade desta conexão. Como ambos, hipotálamo e tecido adiposo marrom, são alvos potencialmente interessantes para o tratamento da obesidade ao avaliamos suas respostas funcionais ao frio em um grupo de 12 pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica. A hipótese é que a atividade do tecido adiposo marrom em resposta ao frio depende de um sinal neural gerado no hipotálamo e que tal resposta possa ser modulada durante a perda de peso. Para testar esta hipótese, os pacientes foram submetidos a uma ressonância eletromagnética funcional, a um *PET-CT scan* e a uma biópsia do tecido adiposo cervical antes e aproximadamente oito meses após serem submetidos à cirurgia bariátrica (*bypass* gástrico com reconstrução em Y de Roux). Durante a ressonância eletromagnética funcional e antes do *PET-CT scan* os pacientes foram expostos a temperatura ambiental de aproximadamente 18°C. Doze voluntários magros e saudáveis foram incluídos como controles do estudo. Estes foram submetidos apenas uma vez à ressonância eletromagnética funcional e ao *PET-CT scan*. Nos voluntários magros, o estímulo ao frio promoveu uma modificação significativa da atividade neuronal no hipotálamo, houve ainda detecção da presença de tecido adiposo marrom funcionante em 45% dos indivíduos. Em obesos, a exposição ao frio não promoveu alteração significativa da atividade neuronal no hipotálamo e apenas um paciente apresentou sinais de atividade do tecido adiposo marrom antes da cirurgia. Após a cirurgia, os pacientes não apresentaram mudanças na responsividade hipotalâmica ao frio, porém quatro pacientes passaram a apresentar sinais de atividade do tecido adiposo marrom. Além disso, após a cirurgia houve aumento significativo da expressão

de transcritos de genes característicos do tecido adiposo marrom determinados por *real-time PCR* em biopsias cervicais. Finalmente, não foram detectados sinais de conectividade entre o hipotálamo e o tecido adiposo marrom em controles magros ou pacientes obesos antes e após a cirurgia. Em conclusão, não há responsividade neural ao frio no hipotálamo de pacientes obesos e a perda de peso subsequente a cirurgia bariátrica não reverteu esta disfunção. A obesidade reduz significativamente a atividade do tecido adiposo marrom em resposta ao frio e a perda de peso normaliza esta resposta. Pelos métodos empregados neste estudo não se detectam sinais de conectividade entre o hipotálamo e o tecido adiposo marrom em resposta a exposição ao frio.

ABSTRACT

The identification of brown/beige adipose tissue in adult humans has motivated the search for methods aimed at increasing its thermogenic activity as an approach to treat obesity. The classic brown adipose tissue in rodents is under the control of sympathetic signals originating in the hypothalamus. However, the putative connection between the depots of brown/beige adipocytes and the hypothalamus in humans has never been explored.

Here, we evaluate the response of the hypothalamus and brown/beige adipose tissue to cold stimulus in twelve obese, non-diabetic humans undergoing Roux-in-Y gastric bypass and in twelve lean controls. Hypothalamic activity in response to cold was determined by functional magnetic resonance, while brown/beige adipose tissue activity was evaluated using a (^{18}F)-FDG PET/CT-scan and real-time PCR measurement of signature genes. Body mass reduction resulted in a significant increase in brown/beige adipose tissue activity in response to cold; however, no change in cold-induced hypothalamic activity was observed after body mass reduction. No correlation was found between brown/beige adipose tissue activation and hypothalamus activity in obese subjects or in lean controls. Thus, in humans, the increase in brown/beige adipose tissue activity related to body mass reduction occurs independently of changes in hypothalamic activity as determined by functional magnetic resonance.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH	Hormônio estimulador dos melanócitos α
AgRP	Proteína Relacionada ao “Agouti”
BAT	<i>Brown Adipose Tissue</i> /Tecido adiposo Marrom
BMI	Body Mass Index
BOLD	Blood oxygenation level dependent
BRITE	Tecido adiposo Beige
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
D2R	Receptor D2 da Dopamina
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERS	Estresse de Retículo Endoplasmático
fMRI	<i>Functional Magnetic Resonance Imaging</i>
FDG	Fluor-deoxi-glucose
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide-1</i> (GLP-1)
IMC	Índice de Massa Corporal
IR	Receptor de Insulina
IRS	Substrato do Receptor de Insulina
LCR	Líquor Cefalorraquidiano
LepR	Receptor de Leptina
LepR-1	Isoforma longa do Receptor de Leptina
MC3R	Receptor 3 de melanocortina
MC4R	Receptor 4 de melanocortina
MCH	Hormônio Concentrador de Melanina

Myf5	Encoding myogenic factor-5
NPY	Neuropeptídeo Y
OMS	Organização Mundial da Saúde
PET	Tomografia por Emissão de Póstron
PI3K	Fosfatidilnositol-3-OH-quinase
PIP2	Fosfatidilnositol Bifosfato
POMC	Pro-opiomelanocortina
RMf	Ressonância Magnética Funcional
RNAm	RNA mensageiro
RYBP	Bypass Gástrico com reconstrução em Y-de-Roux
SUV	<i>Standard Uptake Value</i>
Tmem26	Transmembrana proteína 26
TLR-4	<i>Toll-like Receptor 4</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TRH	Hormônio Liberador de Tireotrofina
UCP-1	<i>Uncoupling Protein 1</i>
WAT	<i>White adipose Tissue</i> / Tecido adiposo Branco

INTRODUÇÃO.....	13
OBJETIVOS.....	24
SUJEITOS E MÉTODOS.....	25
CAPÍTULO I: ARTIGO “ <i>Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity</i> ”.....	30
CONCLUSÃO.....	51
ANEXOS.....	52
REFERÊNCIA.....	62

INTRODUÇÃO

A obesidade representa atualmente um dos maiores desafios em saúde pública no mundo (1). Sua evolução é acompanhada pela ativação de uma resposta inflamatória sistêmica subclínica que tem papel patogênico central em algumas das doenças que a acompanham, tais como, diabetes, aterosclerose e alterações osteomusculares, além de participar do processo que desencadeia o desenvolvimento de algumas neoplasias que incidem com maior frequência em pessoas obesas como os cânceres de cólon, mama, e útero(2, 3).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2014 havia no mundo 1,9 bilhões de indivíduos adultos acima do peso, sendo 600 milhões com diagnóstico de obesidade. Estes valores representam, respectivamente, 39% e 13% da população mundial. Neste mesmo estudo, o número de crianças abaixo de cinco anos com obesidade foi estimado em 42 milhões, projetando um cenário pouco favorável para as próximas décadas(3).

No Brasil, um estudo realizado pelo Ministério da Saúde em parceria com a Vigitel, demonstrou que 52% da população estavam acima do peso em 2014. Considerando que há nove anos este valor era 29%, houve um aumento correspondente a 23% no período. Apesar de não se tratar de uma doença infectocontagiosa, o aumento proporcional do número de casos de obesidade reflete um comportamento epidêmico, pois houve um crescimento exponencial em um período curto de tempo. Nenhuma doença não infecciosa dos séculos XX e XXI apresentou uma prevalência mundial tão expressiva(4). Além disso, a apreensão acerca da prevalência mundial da obesidade ultrapassa a esfera da saúde pública e transcende para a área econômica(5). Segundo estudo realizado pelo governo norte-americano, a estimativa de gasto anual nos Estados Unidos com doenças relacionadas ao excesso de peso atinge valores de US\$ 147-210 bilhões ao ano. Na sua maioria, são pacientes com alto índice de abstenção ao trabalho devido a uma maior frequência de visitas ao serviço de saúde, realização de exames e incapacidade física para a atividade exercida(6). Tal fato resulta em uma perda de produtividade de US\$ 390-540 bilhões anuais. Assim, estima-se que o indivíduo obeso custe 42% a mais para o estado do que o indivíduo não obeso(7-10).

Estudos epidemiológicos a respeito dos fatores desencadeantes da obesidade indicam que alterações genéticas têm papel relevante no aumento da adiposidade(11). Contudo, distúrbios monogênicos afetando, por exemplo, os genes codificadores da leptina, POMC e MCR4, são responsáveis por uma parcela pequena dos casos de obesidade na população

(12). Por outro lado, os fatores ambientais e comportamentais emergem como os principais responsáveis pelo aumento da adiposidade na população mundial (13, 14).

A exposição ambiental a alimentos energeticamente densos, ricos em gorduras e açúcares, e o estilo de vida sedentário adotado por uma parcela considerável da população, tornam difíceis as abordagens que tem por objetivo prevenir o desenvolvimento de novos casos de obesidade, além de terem um impacto negativo em procedimentos comportamentais para o tratamento de pacientes já obesos (15).

A recomendação terapêutica inicial para os indivíduos acima do peso inclui a mudança no estilo de vida visando adquirir um hábito alimentar mais saudável além do estímulo à prática regular de atividade física. Contudo, os benefícios iniciais adquiridos com a redução do peso são em sua maioria seguidos do retorno à ingestão calórica resultando na recuperação de massa corporal, o que configura uma elevada taxa de recorrência decorrente de uma baixa adesão ao esquema proposto (16, 17).

Frente à falha da abordagem comportamental, existe a possibilidade de se utilizar fármacos que, por meio de diferentes mecanismos contribuem para a redução da adiposidade (18). A maior parte das drogas aprovadas para o tratamento da obesidade resulta em reduções máximas da massa corporal de até 15%. Contudo, essa redução geralmente é acompanhada de efeitos colaterais muitas vezes intoleráveis. Além disso, muitos dos fármacos não apresentam estudos que demonstrem segurança cardiovascular que viabilizem sua utilização por períodos prolongados (19-25). Por fim, é comum que pacientes em uso de fármacos desenvolvam ao longo do tratamento perda de adesão e eficácia resultando em elevadas taxas de recorrência da doença após a interrupção do uso dos mesmos (26). Desta forma, a farmacoterapia para a obesidade tem se revelado frustrante, resultando em efeitos em geral discretos ou inexistentes em longo prazo (18).

O rápido crescimento na prevalência de obesidade, aliado à falha nas abordagens comportamentais e farmacológicas e, principalmente, o crescimento do número de obesos com índices de massa corpórea superior a 40 e portadores de várias comorbidades, estimulou, ao longo das últimas duas décadas, o crescente emprego da cirurgia bariátrica como uma ferramenta terapêutica efetiva no controle da doença (27). Inúmeros estudos demonstraram benefícios gerais resultantes da perda de peso e das modificações da fisiologia digestória obtidos com a cirurgia bariátrica (28, 29). Tais benefícios não se restringem à redução da adiposidade. Estudos mostram melhora da homeostase da glicose (30, 31), redução das taxas de lipídeos sanguíneos (32-34), redução da mortalidade por doença cardiovascular

(35), redução dos níveis de pressão arterial sistêmica (36, 37), além de várias outras consequências que resultam na melhora considerável da qualidade de vida dos pacientes(38).

O controle do quadro de diabetes após a cirurgia bariátrica é maior nos primeiros dois anos (72,3 %) do que após 15 anos (30,4%). Contudo, ainda assim, em longo prazo, a remissão da hiperglicemia é significativamente superior a aquela observada em pacientes submetidos somente a abordagens comportamentais e farmacológicas sendo 16,4% nos primeiros 2 anos de observação e 6,5% nos 5 anos; $p < 0,001$)(30). A princípio, acreditava-se que a melhora na homeostase da glicose se devesse unicamente à redução da ingestão calórica e à redução da adiposidade, entretanto, estudos têm demonstrado que tal efeito decorre de múltiplos fatores e mecanismos (39). Particularmente, quando submetidos à técnica de *bypass* gástrico com reconstrução em Y-de-Roux (RYGB), os pacientes apresentam uma melhora da homeostase da glicose em decorrência de dois mecanismos principais: i, melhora da sensibilidade à insulina no fígado, induzida em parte pela restrição calórica; e, ii, melhora da função de célula beta pancreática associada a um aumento da secreção pós-prandial de GLP-1(40). Estudos recentes têm revelando ainda que modificações da microbiota intestinal e da concentração de ácidos biliares no sangue contribuem para a melhora metabólica dos pacientes (41). O *Swedish Obese Subjects* (SOS) foi um dos maiores estudos prospectivos e controlados que avaliaram o impacto da cirurgia bariátrica em vários aspectos metabólicos e cardiovasculares dos pacientes. O estudo relatou que houve uma perda máxima de peso nos primeiros dois anos seguida por uma estabilização da massa corporal em 25% ao longo de até 15 anos (30). Houve ainda uma redução significativa do número de mortes decorrentes de complicações cardiovasculares (OR ajustada 0,47; IC 95% 0,29-0,76; $p = 0,002$) e menor incidência de eventos cardiovasculares totais (infarto agudo do miocárdio + acidente vascular cerebral) (OR ajustada 0,67, IC 95% 0,54-0,83; $p < 0,001$) em relação ao tratamento convencional, após 15 anos de seguimento(30).

Numa revisão recente que teve por objetivo avaliar todos os estudos que abordaram os mecanismos potencialmente envolvidos nos efeitos benéficos associados à perda de peso promovida pela RYGB, os autores concluem que a redução da ingestão alimentar e sua associação com modificações nos níveis sanguíneos de peptídeos gastrointestinais como GLP-1, PYY e ghrelina, têm uma relevância maior em curto prazo no metabolismo enquanto que em longo prazo o aumento do gasto energético é o mecanismo responsável pela perda de peso (42).

Mesmo tendo em vista os indiscutíveis benefícios da cirurgia bariátrica como método terapêutico para o combate à obesidade, é inegável que o risco cirúrgico, o caráter mutilador, o impacto nutricional e o potencial para indução de alterações comportamentais que incluem o alcoolismo, a compulsão e a anorexia, estimulam a busca por novas opções terapêuticas que sejam eficientes porém que resultem em menor risco geral para o paciente(43, 44).

Neste sentido, trabalhos experimentais desenvolvidos ao longo dos últimos 60 anos têm buscado identificar potenciais alvos para o tratamento da obesidade. Entre as áreas de grande interesse, há destaque para os mecanismos neurais de controle da fome e do gasto energético e a regulação da termogênese (45-57) .

O controle do balanço energético é exercido por subpopulações de neurônios localizados principalmente no hipotálamo. Estudos realizados na década de 1950 revelaram que neurônios localizados na região lateral do hipotálamo eram responsáveis por promover fome, enquanto neurônios da região paraventricular promoviam saciedade(58-60).A identificação da leptina em 1994, representou um dos grandes avanços da endocrinologia recente e permitiu um avanço sem precedente na elucidação dos mecanismos de controle da homeostase energética, incluindo o controle da fome, da termogênese e da regulação da massa de tecido adiposo do organismo (61).

A leptina é um hormônio com características moleculares e funcionais semelhantes às citocinas da família de citocinas do tipo I (62). A leptina é produzida principalmente pelo tecido adiposo sendo secretada na circulação em uma quantidade diretamente proporcional à massa de tecido adiposo do indivíduo(63).No sangue, a leptina tem como alvo principal neurônios localizados no núcleo arqueado do hipotálamo aonde chega após atravessar a barreira hematoencefálica presente na região de eminência média (64).

No núcleo arqueado existem duas subpopulações principais de neurônios que expressam o receptor de leptina, denominado LepR (ou ObR) (62). A primeira subpopulação, cuja atividade é estimulada pela leptina,expressa a proopiomelanocortina (POMC), que é processada para produzir o neurotransmissor denominado hormônio estimuladora dos melanócitos- α (α -MSH)(48). Este,atua em neurônios hipotalâmicos de segunda ordem localizados principalmente nos núcleos paraventricular e lateral do hipotálamo, ativando respostas por meio dos receptores melanocortina-3 e -4 (MC3R e MC4R) (65). Em geral, a ativação do sistema melanocortinérgico resulta em respostas catabólicas, reduzindo a fome e aumentando o gasto energético (66). A segunda subpopulação de neurônios tem a sua atividade suprimida pela leptina e sintetizam os peptídeos orexigênicos, proteína relacionada

ao Agouti (AgRP) e neuropeptídeo Y (NPY), ambos com funções anabólicas (48). O AgRP é um antagonista do MC3R e MC4R, e o neuropeptídeo Y atua em receptores Y estimulando a ingestão alimentar(48). Da mesma forma que o α -MSH, NPY e AgRP atuam em neurônios de segunda ordem, exercendo efeitos contrários àqueles promovidos pelo sistema melanocortinérgico (48).

Além da leptina, outro importante regulador da adiposidade, tanto por suas ações periféricas quanto pelas suas ações centrais, é a insulina (57). Da mesma forma que a leptina, a insulina atravessa a barreira hematoencefálica e age em receptores expressos nos mesmos neurônios responsivos à leptina(67). Após a ligação ao seu receptor, ocorre uma autofosforilação do mesmo, resultando na ativação de sua função tirosina quinase(68). Subsequentemente, substratos do receptor (*insulin receptor substrates*, IRSs) são recrutados e fosforilados, dando início a uma cascata de reações intracelulares que se somam as ações da leptina promovendo a redução da fome e o aumento do gasto energético global do organismo(69).

A existência de hiperleptinemia e hiperinsulinemia em pacientes e modelos experimentais de obesidade levou a suspeita de que a resistência hipotalâmica às ações catabólicas destes hormônios contribuísse de forma fundamental para o progressivo aumento da adiposidade(70). De fato, estudos experimentais revelaram que o consumo de uma dieta hiperlipídica induz a redução progressiva da resposta hipotalâmica à leptina e à insulina (55, 70, 71). Tal inibição decorre da ativação de uma resposta inflamatória local, desencadeada pela ativação de receptores do sistema imune inato denominado, TLR4 e também pela indução de estresse de retículo endoplasmático (72-74). Num primeiro momento, a resistência hipotalâmica às ações da leptina e insulina promove apenas alterações na produção e liberação de neurotransmissores; porém, com o passar do tempo, o processo inflamatório contribui para perdas aparentemente irreversíveis de vários componentes hipotalâmicos do complexo sistema que regula a homeostase energética, incluindo a apoptose de neurônios (49, 51, 52). Como consequência do distúrbio funcional do hipotálamo ocorre um controle inadequado da fome acompanhado de um gasto energético insuficiente para manter o equilíbrio energético do organismo (55, 75).

A maior parte dos estudos que levou à caracterização da disfunção hipotalâmica na obesidade foi realizada em modelos experimentais. Em humanos, o hipotálamo é uma região de difícil acesso e somente avanços em métodos de neuroimagem, têm contribuído recentemente para que o hipotálamo de humanos obesos pudesse finalmente ser avaliado (76,

77). Os indivíduos submetidos à cirurgia bariátrica apresentam no pós-operatório a redução dos níveis séricos de leptina, e, provavelmente, uma redução da resistência a leptina no hipotálamo cursando desta forma com melhor resposta dos mecanismos de saciedade (39).

Dentre esses métodos, destaca-se a Ressonância Magnética Funcional (RMf) que permite detectar as alterações funcionais em áreas específicas do sistema nervoso central(76). Quando pacientes são submetidos a um determinado estímulo durante o exame, há um aumento da atividade neuronal na zona ativada em resposta ao estímulo. Os neurônios ativados consomem mais oxigênio levando a uma redução dos níveis deoxi-hemoglobina o que se acompanha da elevação de oxi-hemoglobina. Como reação, há um aumento de fluxo sanguíneo para a região, fazendo dessa forma com que diminua a concentração de desoxi-hemoglobina. Essa mudança de concentração possui uma propriedade paramagnética que funciona como um contraste endógeno. Esse fenômeno, denominado sinal BOLD (*blood oxygenation level dependent*), é utilizado para avaliações quantitativas que refletem a atividade neuronal (77).

Estudos conduzidos com indivíduos obesos demonstraram diferenças significativas, quando comparado com indivíduos magros, em relação à atividade neural estimuladas por figuras com alimentos de alto valor energético. As principais diferenças funcionais ocorrem no striatum, ínsula, córtex orbitofrontal e amígdala (78, 79). Tais regiões pertencem a sistema límbico e alterações de sua funcionalidade se devem a falhas no mecanismo recompensa refletindo na motivação do indivíduo obeso pela obtenção do alimento palatável (80, 81)e, resultando no maior consumo calórico e aumento da adiposidade(82, 83).

Em estudo conduzido previamente pelo nosso grupo, avaliaram-se através de RMf, pacientes com obesidade grau III antes e 8 meses após serem submetidos à cirurgia bariátrica pela técnica de RYBP. Neste estudo a atividade hipotalâmica foi estimulada com uma sobrecarga de glicose durante a obtenção de imagens da RMf. Antes da cirurgia, os pacientes apresentavam menor responsividade neural à glicose no hipotálamo se comparados aos voluntários sadios e magros. Após a perda de peso, houve uma reversão parcial da disfunção (53).

A demonstração da presença de tecido adiposo marrom em seres humanos adultos criou expectativas positivas quanto ao seu potencial como alvo para abordagens terapêuticas contra a obesidade (84, 85). Por mais de 60 anos, estudos se concentraram na caracterização da sua atividade termogênica em mamíferos hibernantes (86, 87). Acreditava-se que em humanos, sua presença ocorria somente durante etapas iniciais da vida, período durante o qual

há grande instabilidade térmica (88), e que durante o crescimento ocorreria uma involução fisiológica(89). Entretanto, alguns estudos relataram a sua presença em adultos, porém por algum tempo a relevância deste fato foi subestimada (90). Somente em 2009, com a publicação simultânea de três artigos no *The New England Journal of Medicine*, o tecido adiposo marrom voltou a chamar a atenção da comunidade científica (91-93).

A identificação do tecido adiposo marrom em humanos adultos ocorreu em decorrência da observação da captação anômala de fluoro-deoxi-glicose (FDG) em pacientes submetidos a *PET-CT scan* por razões diagnósticas várias. Em algumas pessoas notava-se captação do radionucleosídeo em regiões cervicais, supraclaviculares e paramediastinais de forma simétrica e recorrente. (94-97). Cypess e colaboradores analisaram 3.640 imagens de tomografia por emissão de pósitrons combinada à tomografia computadorizada (PET-CT) em 1.972 pacientes e identificaram depósitos substanciais de tecido adiposo marrom desde a região cervical anterior até o tórax, em 7,5% das mulheres e 3,1% dos homens. Na análise de amostra dessa região através de técnica de coloração por hematoxilina/eosina e imunohistoquímica, identificou depósitos de adipócitos multiloculares, ricos em inervação e vascularização e presença abundante de mitocôndrias além da expressão da proteína UCP-1. Neste mesmo estudo observaram que havia uma correlação inversa entre a quantidade de tecido adiposo marrom e o índice de massa corpórea (92). Essa correlação negativa com o IMC sugeriu aos autores que o tecido adiposo marrom executaria um papel de controle metabólico(92, 93).

Outro estudo avaliou a correlação da captação de FDG com a obesidade e a exposição ao frio em 24 homens. Apenas um indivíduo não apresentou captação, sendo este o com maior IMC, corroborando os relatos da relação inversa da obesidade e a presença de captação de glicose pelo BAT (93). Este mesmo estudo confirmou a capacidade de recrutamento/ativação do tecido através do estímulo ao frio. Em situações de termoneutralidade (22°C), apenas 3 dos 24 indivíduos apresentaram captação. Quando submetidos a um protocolo de exposição ao frio por 2 horas (16°C) este número se elevou para 23. Houve também diferença significativa na atividade do tecido, medido por um índice denominado *Standard Uptake Value* (SUV), sendo que nos pacientes com IMC acima de 25, essa atividade estava reduzida(93).

Num terceiro estudo publicado no *The New England Journal of Medicine* cinco indivíduos adultos saudáveis foram submetidos ao PET-CT durante a exposição ao frio. Todos apresentaram captação aumentada do FDG na região supraclavicular. Três destes indivíduos foram submetidos à biópsia do tecido desta região, e a análise revelou a presença

de expressão de transcritos marcadores do tecido adiposo marrom, como UCP-1, DIO2, PGC1 α , PRDM16 e ADRB3(91).

De uma forma geral, os estudos publicados no ano de 2009, colocaram o tecido adiposo marrom como um dos alvos potenciais para o tratamento de obesidade e doenças metabólicas pois revelaram que: i, a exposição ao frio é capaz de estimular sua atividade (93); ii, existe uma correlação negativa com o índice de massa corpórea (IMC), evidenciando que a atividade do tecido decai quanto maior a adiposidade do paciente; iii, há ainda correlação negativa com a idade e valores glicêmicos(92). Como consequência destes achados, pesquisadores têm buscado avanços na caracterização do tecido adiposo marrom, com o objetivo de encontrar oportunidades terapêuticas mais promissoras que aquelas atualmente disponíveis (98).

Um dos avanços obtidos como parte da caracterização minuciosa do tecido adiposo marrom, foi a identificação de um tipo de tecido adiposo termogenicamente ativo, que tem grande semelhança morfológica e funcional com o tecido adiposo marrom, porém tem origem embrionária diferente (99). Tal tecido foi batizado de tecido adiposo bege (ou ainda *brite*, do inglês *Brown and white*) (100, 101). Nos parágrafos seguintes destacaremos as principais características morfológicas, funcionais e moleculares de cada um dos subtipos de tecido adiposos atualmente conhecidos.

O tecido adiposo branco tem como função principal o armazenamento de energia na forma de lipídeos, além de produzir uma série de substâncias que atuam em diversos locais do organismo, modulando o funcionamento metabólico. Morfologicamente apresenta células com vacúolos grandes e únicos, pouca presença de mitocôndrias, vascularização e inervação (102). Por outro lado o tecido marrom clássico, é ricamente vascularizado e innervado. Suas células são multiloculadas e ricas em mitocôndrias (103). Funcionalmente o tecido adiposo marrom é capaz de regular o gasto energético através de um processo denominado termogênese adaptativa(104). Este processo depende da expressão de uma proteína denominada UCP-1 (*uncoupling protein 1*), presente na membrana interna da mitocôndria(105). Esta proteína permite a passagem de prótons através da membrana desacoplando a fosforilação oxidativa da síntese de ATP e gerando calor (106, 107). O tecido adiposo marrom clássico tem sua origem em uma linhagem celular que expressa o antígeno de superfície Myf-5, a mesma que dá origem aos miócitos(99).

Recentemente, a identificação de um novo tipo tecido adiposo com capacidade termogênica semelhante ao marrom quando estimulado, em meio a depósitos de tecido adiposo branco, permitiu a caracterização de um segundo subtipo de célula adiposa termogênica. Essas células se originam de precursores Myf5 negativo e se localizam em regiões habituais de tecido adiposo branco. Entretanto, quando submetidas a estímulos específicos, como exposição crônica ao frio ou tratamento com noradrenalina, têm a capacidade de se transdiferenciar e expressar UCP-1(99, 108, 109). Este tipo de tecido adiposo com capacidade pró termogênica foi denominado de bege ou *brite* caracterizando o fenômeno denominado *browning* (101). Da mesma forma que o tecido marrom clássico, este apresenta a expressão de genes marcadores e de fatores de transcrição semelhantes aos do marrom, tais como: UCP-1, Cidea, PGC-1 α , C/EBP α , PPAR γ , e PRDM16(109). Apesar da semelhança molecular, bege e marrom devem ser tratados como tecidos distintos (99). Além de não derivar de células precursoras Myf5, o tecido bege expressa fatores de desenvolvimento específicos (110) e presença de uma assinatura genética única (101, 111). Outra diferença notável é que o tecido marrom expressa altos níveis de UCP-1 mesmo em situações sem estímulo, enquanto que o bege a expressa apenas quando estimulado(112, 113).

Recentemente foi realizada uma avaliação extensa sobre a presença de marcadores moleculares que supostamente caracterizam cada um dos subtipos de tecido adiposo (114). Foram analisados tecidos e culturas de células primárias obtidas a partir de três regiões anatómicas distintas de camundongos: i, interescapular (marrom), inguinal (bege) e epididimal (branco). Os marcadores avaliados foram definidos a partir de estudos pregressos que relataram suas presenças nas diversas coleções de tecido adiposo (101, 111). De forma inesperada, a maioria dos marcadores avaliados não foi específico o suficiente para definir qualquer subtipo de adiposo, quais sejam: Car4, Cited1, Ebf3, Eva1, Fbxo31, Fgf21, Lhx8, Hoxc8, e Hoxc9. Houve especificidade apenas para Zic1, expresso no tecido adiposo marrom; Cd137, Epsti1, Tbx1, e Tmem26, expressos no tecido adiposo bege; e Tcf21, expresso no tecido adiposo branco. Em um estudo com humanos, foram realizadas biópsias de tecidos superficiais e profundos na região do pescoço e, empregando os mesmos marcadores, identificou-se maior semelhança com o tecido adiposo marrom na região profunda do pescoço(115).

Enquanto a caracterização molecular dos distintos subtipos de tecido adiposo teve grande avanço nos últimos anos, a regulação neural da termogênese, particularmente em humanos, ainda é pouco compreendida. Em animais experimentais, o sistema nervoso central

ativa um sinal simpático para modular a termogênese no tecido adiposo marrom. No caso do estímulo desencadeado pelo frio, a presença de células termoreceptoras na pele do animal desencadeia um circuito neural complexo que se comunica com células do cérebro aos quais ativam uma resposta simpática que induz a termogênese no tecido adiposo marrom(116). Em humanos, este mecanismo neuronal até o tecido adiposo marrom não está elucidado.

Contudo, sabemos que a ativação do BAT depende de um mecanismo de geração de calor denominado *non-shivering*, enquanto que o frio extremo poderia desencadear tremores e o gasto energético aumentaria à custa da ativação deste mecanismo de *shivering* (104). Desta forma, em estudos em humanos, protocolos padronizaram a temperatura ótima na qual o indivíduo ativa o BAT sem ativação do gasto energético pelos tremores (93).

Em um estudo realizado no nosso laboratório avaliou-se a atividade termogênica induzida por TNF- α no hipotálamo. Em altas concentrações, como aquelas observadas em situação de sepse ou e caquexia, o TNF- α agindo no hipotálamo, promoveu um aumento da expressão de UCP-1 e de marcadores de termogênese, PGC-1 α e Dio2, além de um aumento da massa do tecido adiposo marrom. Por outro lado, concentrações mais baixas de TNF- α como aquelas presentes na obesidade, não foram capazes de ativar o tecido adiposo marrom pois não houve um aumento da atividade simpática (46). No mesmo estudo, procedimentos de denervação simpática comprovaram a via de conexão entre o hipotálamo e o tecido adiposo marrom. Este mesmo estudo realizou a denervação desses camundongos com alta concentração de TNF- α em SNC. E, curiosamente, não houve um recrutamento do tecido adiposo marrom, demonstrando assim o controle simpático que o SNC exerce sobre o tecido(46).

Apesar da inquestionável potencialidade do tecido adiposo marrom como alvo para o tratamento da obesidade, e do papel do sistema nervoso simpático como ativador de sua função termogênica, estudos clínicos em sua maioria falharam ao tentar promover mudanças no balanço energético com fármacos com ação β -adrenérgica. (117-120).

Neste sentido, a caracterização de eventuais conexões entre o sistema nervoso central, particularmente o hipotálamo, e coleções de tecidos adiposos termogenicamente ativos em humanos, podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes para a obesidade. Neste estudo nos aventamos a hipótese que, uma eventual conexão entre o hipotálamos e o tecido adiposo marrom/bege poderia ser detectada por métodos de imagem e que a mesma, caso exista, possa ser modulada durante a perda de massa corporal em pacientes obesos submetidos à cirurgia bariátrica.

JUSTIFICATIVA

As modalidades terapêuticas em curso para o tratamento de obesidade são restritas e, em geral, pouco eficientes. A abordagem comportamental, com uso concomitante de dietas hipocalóricas e estímulo à atividade física leva a perda de no máximo 10 a 15% do peso inicial no período de seis meses a um ano, porém com frequência, se acompanha de falência tardia. Com relação aos fármacos atualmente aprovados para uso, a perda máxima em seis meses raramente ultrapassa 15% do peso inicial e recidivas também são a regra. Por essa razão, pacientes com IMC superior a 40 kg/m² ou superior a 35 kg/m² com comorbidades, têm sido frequentemente tratados com cirurgia bariátrica. Além dos riscos imediatos desta conduta intervencionista, os pacientes podem apresentar problemas tardios associados a distúrbios da absorção de nutrientes e comportamentais. Desta forma, dada à importância epidemiológica da obesidade e devido à inexistência de esquemas de tratamentos que sejam simultaneamente eficientes e seguros, deve-se estimular a busca por novos alvos e métodos que proporcionem avanços na profilaxia e terapêutica da obesidade. Neste contexto, acreditamos que estudos que avaliem os mecanismos de controle da atividade do tecido adiposo marrom e do hipotálamo em pacientes obesos possam oferecer novas perspectivas nessa área.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da redução de peso após cirurgia bariátrica na atividade do tecido adiposo marrom e sua conexão com o hipotálamo em humanos.

SUJEITOS E MÉTODOS

Tipo de estudo. Estudo prospectivo.

Pacientes. Foram selecionados 12 pacientes do sexo feminino do Ambulatório de Obesidade do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas de acordo com os seguintes critérios: i, inclusão, mulheres entre 18 e 60 anos de idade, com índice de massa corpórea maior ou igual a 40 kg/m² e massa corpórea menor ou igual a 150 kg; ii, exclusão, diabetes mellitus, de acordo com os critérios da Academia Americana de Diabetes, doença inflamatória ou infecciosa aguda ou crônica, doença neurológica, doença psiquiátrica, tabagismo, consumo de álcool maior ou igual a 30 g por dia para homens e 15g por dia para mulheres, uso de drogas ilícitas, antiinflamatórios não esteroidais, corticóides, beta bloqueadores, beta-agonistas, inibidores de recaptção de serotonina, diagnóstico de neoplasias, gestação, níveis de enzimas hepáticas > 3 vezes o limite superior da normalidade, insuficiência renal crônica, colecistectomia previa. **Controles.** Doze voluntárias selecionadas de acordo com os seguintes critérios: i, inclusão, mulheres, pareados por idade com o grupo de pacientes obesos, com índice de massa corpórea menor que 25 kg/m²; ii, exclusão, mesmos critérios que o grupo de pacientes obesos. Um total de 149 pacientes foi avaliado no primeiro ciclo de triagem. Sessenta e dois pacientes foram selecionados para uma segunda rodada de avaliação, que consistia em exames de sangue. Doze pacientes foram selecionados para o estudo. Para inclusão de voluntárias controles magras, entrevistamos 27 candidatas. Doze foram excluídas por causa do uso de medicação; duas por causa de próteses metálicas; duas por causa da idade e cinco por não aderir ao protocolo. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

Técnica cirúrgica. Bypass gástrico em Y de Roux (RYGBP) por laparotomia mediana. Sucintamente, o volume gástrico é reduzido através da criação de uma pequena bolsa (30 ml) junto à curvatura menor do estômago. O jejuno é seccionado a 150 cm do ângulo de Treitz e anastomosado à bolsa gástrica, para onde o alimento é redirecionado (alça alimentar ou eferente). A maior parte do estômago, o duodeno e o jejuno proximal ficam excluídos da passagem dos alimentos (alça biliar ou aferente, em torno de 100 cm). A anastomose da alça excluída é feita a 150 cm da união gastrojejunal, em Y de Roux. O trajeto da alça comum ao alimento e ao suco biliopancreático fica limitada a cerca de 450 cm.

Ressonância eletromagnética funcional (fMRI). As imagens foram coletadas em um scanner 3.0T Achieva Phillips, do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas. A sala foi mantida a 17-18°C (contudo, durante a aquisição da imagem funcional, há um aquecimento gerado pelo próprio aparelho que, eventualmente eleva a temperatura da sala para até 21 ° C. Invariavelmente, no momento da retirada do cobertor para a exposição ao paradigma, a temperatura era 18°C. Os pacientes foram admitidos na sala de exame vestidos com roupas leves (0,49 clo) e cobertos com cobertores. Após o posicionamento, o protocolo para aquisição de imagens estruturais precedia o protocolo de funcional (fMRI); imagens sagitais foram adquiridas ponderadas em T1 com uma repetição 7.0ms de tempo e um eco 3.2ms tempo, gerando voxels de 1,0 mm³ e um campo de visão de 240 x 240. Para fMRI, imagens planas eco ocorreu durante 10 minutos enquanto os pacientes estavam cobertos. Os cobertores foram a seguir retirados e a aquisição de imagens continuou por mais 25 min. As imagens foram adquiridas em 40 secções axiais e ponderadas de T2; o tempo de repetição foi de 2,0 s e o tempo de eco foi de 30 ms, gerando voxels de 3,0 mm³ e um campo de visão de 240 x 240. Cada imagem obtida foi inicialmente realinhada, a fim de normalizar a posição em três dimensões, e, em seguida alisada para resolver pequena distorção com a ferramenta SPM8 (<http://www.fil.ion.ucl.ac.uk/spm>). Em seguida, o local do sinal do hipotálamo foi extraído utilizando o WFU Pickatlas. Finalmente, todos os resultados obtidos durante a aquisição de imagens, para cada paciente, foram transferidas para uma tabela utilizando-se a média dos grupos para estudar as variações de sinal após a exposição ao frio. Para avaliar o impacto da exposição ao frio sobre a atividade hipotalâmica, a intensidade média do sinal durante os cinco minutos que precedem a exposição ao frio foram comparados com a média da intensidade do sinal durante os cinco minutos subsequentes à exposição ao frio. Baseado na média de mudança da atividade do hipotálamo após exposição ao frio no grupo controle magra, foi definido o valor de 200×10^{-5} unidades de sinal como a mudança mínima necessária para ser considerado como positivo. Este protocolo, que determina a atividade neuronal em todo o hipotálamo, foi desenvolvido com algumas modificações baseado em dois estudos anteriores (1,2). Além disso, foi também avaliado um protocolo para a avaliação independente dos neurônios do hipotálamo anterior e posterior (3).

(18F)-FDG PET / CT. As imagens foram adquiridas e processadas usando o equipamento Siemens Somatom Emotion Duo Biograph (Siemens Medical Solutions, Chicago, IL) e analisadas utilizando uma estação Syngo VB10B WinNT 4.0, também da Siemens. O (18F)-FDG foi obtido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN, São Paulo,

Brasil). Pacientes e controles foram admitidos a uma sala de exame preparatório com roupas leves (0,49 clo) e expostos durante 1,0 h à temperatura de 17-18°C. Uma injeção intravenosa de 4,0 MBq / kg de (18F)-FDG foi aplicada e os pacientes permaneceram nesta mesma sala por mais 1,0 h. Após este período, os pacientes foram levados para a sala de aquisição de imagens. A aquisição de imagens estruturais pela Tomografia Computadorizada foi realizada com dose de 130 kV, 50-80 mA, 0,8 s por rotação CT, com *pitch* de 4,0-5,0 mm, campo de visão de 500 mm e uma velocidade de digitalização de 24,6mm/s. O PET scan foi realizado imediatamente após a tomografia computadorizada, no sentido crânio-caudal, sem mudar a posição do paciente. As imagens foram adquiridas em cinco a sete posicionamentos, 4,0 min / posição. Tecido marrom/beige foi considerada presente se havia captação do radio fármaco correspondente ao valor mínimo padronizado de 2,0 SUV em áreas com densidade de tecido adiposo (-250 a -50 unidades Hounsfield). Com base nestes parâmetros, os sujeitos foram definidos com negativos ou positivos para a presença do tecido adiposo marrom/beige ativo. Além disso, o SUV também foi obtido a partir do músculo glúteo para avaliar possibilidade de captação pela atividade de tremor muscular devido à exposição ao frio. SUV máximo foi utilizado em todas as comparações. Este protocolo foi baseado num estudo publicado previamente (4).

Biópsia do tecido adiposo marrom. A primeira biópsia de tecido adiposo cervical, sítio de localização preferencial do tecido adiposo marrom, foi realizada durante a cirurgia bariátrica. A segunda biópsia cervical ocorreu oito meses após a cirurgia sendo realizada sob anestesia local em local vizinho ao sítio da primeira biópsia. Os fragmentos obtidos foram imediatamente divididos em partes para análise por *real-time PCR* e histologia, e colocados em recipientes apropriados para congelamento e transporte em nitrogênio líquido. Em seguida foram armazenados em dois freezers distintos, a -80°C.

Biópsia do tecido adiposo branco. Foi realizado no mesmo tempo cirúrgico que o procedimento de cirurgia bariátrica. O fragmento foi obtido da parede do abdome sendo imediatamente dividido em partes para análise por *real-time PCR* e histologia e colocados em recipientes apropriados para congelamento e transporte em nitrogênio líquido. Em seguida foram armazenados em dois freezers distintos, a -80°C.

Coleta de sangue para avaliação de parâmetros celulares, bioquímicos, inflamatórios e hormonais. Foram coletados 30 ml de sangue previamente à cirurgia e antecedendo a segunda fase do protocolo aos oito meses pós-cirurgia. O sangue foi imediatamente encaminhado para o laboratório de sinalização celular. Um volume de 20 ml foi utilizado para extração de soro,

dividido em quatro alíquotas de similar volume e armazenamento a -80°C. Um volume de 10 ml foi utilizado imediatamente para estudos com citometria de fluxo. O soro foi utilizado para mensurações de insulina por ELISA (Kit da Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA).

Exames realizados pela rotina do Hospital de Clinicas da UNICAMP. No período pré-operatório e na época da realização da segunda biópsia de adiposo, foram solicitados os seguintes exames pela rotina do Hospital de Clinica da UNICAMO: hemograma, VHS, glicose, hemoglobina glicada, colesterol total e frações, AST, ALT, fosfatase alcalina, gama-GT, uréia, creatinina, ácido úrico, TSH, T4-Livre e urina I.

Exames adicionais. Os seguintes exames foram solicitados pela rotina do HC assim que os pacientes foram selecionados para inclusão no estudo: sorologias para hepatite B, hepatite C, HIV e ácido biliar, teste de abuso de drogas ilícitas através de análise urinária.

PCR-real time. A partir do material proveniente das biópsias, o RNA total foi preparado usando um kit de extração de RNA de tecido adiposo da Qiagen (RNeasy Mini Kit lipídica tecidual - # 74804), seguindo as recomendações fornecidas pelo fabricante. PPIA foi usado como um gene de controle e a variabilidade da sua expressão em todas as amostras foi inferior a 1,0%. Os iniciadores foram adquiridos a partir de Invitrogen (Life Technologies) e IDT (Integrated DNA Technologies). Tabela S1 apresenta todos os mRNAs testados, o número de kit, fabricante e especificidade de tecido (WAT ou BAT / bege). Foi considerado como positivo para a presença de tecido adiposo marrom/beige a expressão de quatro ou mais transcritos específicos para tecido adiposo marrom/beige em níveis superiores a três vezes aos níveis detectados em tecido adiposo branco.

Histologia e imunofluorescência. As amostras de tecidos congelados recolhidos a partir da região supraclavicular e da parede abdominal, foram empregadas na coloração com hematoxilina-eosina para avaliação da morfologia do tecido adiposo e ensaio de imunofluorescência para detectar UCP1, de acordo com um protocolo anteriormente descrito.(5)

Referências da metodologia

1. Liu Y, Gao JH, Liu HL, and Fox PT. The temporal response of the brain after eating revealed by functional MRI. *Nature*. 2000;405(6790):1058-62.
2. van de Sande-Lee S, Pereira FR, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, Chaim EA, Pareja JC, Geloneze B, Li LM, et al. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes*. 2011;60(6):1699-704.
3. Smeets PA, de Graaf C, Stafleu A, van Osch MJ, and van der Grond J. Functional magnetic resonance imaging of human hypothalamic responses to sweet taste and calories. *The American journal of clinical nutrition*. 2005;82(5):1011-6.
4. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, Schrauwen P, and Teule GJ. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *The New England journal of medicine*. 2009;360(15):1500-8.
5. Cintra DE, Ropelle ER, Moraes JC, Pauli JR, Morari J, Souza CT, Grimaldi R, Stahl M, Carnevalheira JB, Saad MJ, et al. Unsaturated fatty acids revert diet-induced hypothalamic inflammation in obesity. *PloS one*. 2012;7(1):e30571.

CAPÍTULO 1. ARTIGO

“DISTINCT REGULATION OF HYPOTHALAMIC AND BROWN/BEIGE ADIPOSE TISSUE ACTIVITIES IN HUMAN OBESITY”

Publicado no International Journal of Obesity, (London) May, 2015.

PMID:25994805

ORIGINAL ARTICLE

Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity

B Rachid¹, S van de Sande-Lee¹, S Rodovalho¹, F Folli², GC Beltramini³, J Morari¹, BJ Amorim⁴, T Pedro⁵, AF Ramalho¹, B Bombassaro¹, AJ Tincani⁶, E Chaim⁶, JC Pareja^{6,7}, B Geloneze⁷, CD Ramos⁴, F Cendes⁵, MJA Saad⁸ and LA Velloso¹

BACKGROUND/OBJECTIVES: The identification of brown/beige adipose tissue in adult humans has motivated the search for methods aimed at increasing its thermogenic activity as an approach to treat obesity. In rodents, the brown adipose tissue is under the control of sympathetic signals originating in the hypothalamus. However, the putative connection between the depots of brown/beige adipocytes and the hypothalamus in humans has never been explored. The objective of this study was to evaluate the response of the hypothalamus and brown/beige adipose tissue to cold stimulus in obese subjects undergoing body mass reduction following gastric bypass.

SUBJECTS/METHODS: We evaluated twelve obese, non-diabetic subjects undergoing Roux-in-Y gastric bypass and 12 lean controls. Obese subjects were evaluated before and approximately 8 months after gastric bypass. Lean subjects were evaluated only at admission. Subjects were evaluated for hypothalamic activity in response to cold by functional magnetic resonance, whereas brown/beige adipose tissue activity was evaluated using a (F 18) fluorodeoxyglucose positron emission tomography/ computed tomography scan and real-time PCR measurement of signature genes. **RESULTS:** Body mass reduction resulted in a significant increase in brown/beige adipose tissue activity in response to cold; however, no change in cold-induced hypothalamic activity was observed after body mass reduction. No correlation was found between brown/beige adipose tissue activation and hypothalamus activity in obese subjects or in lean controls. **CONCLUSIONS:** In humans, the increase in brown/beige adipose tissue activity related to body mass reduction occurs independently of changes in hypothalamic activity as determined by functional magnetic resonance.

International Journal of Obesity advance online publication, 23 June 2015;
doi:10.1038/ijo.2015.94

¹Laboratory of Cell Signaling, Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil; ²Department of Medicine, Division of Diabetes, University of Texas Health Science Center at San Antonio, San Antonio, TX, USA;

³Neurophysics Group, Institute of Physics Gleb Wataghin, University of Campinas, Campinas, Brazil; ⁴Division of Nuclear Medicine, Department of Radiology, University of Campinas, Campinas, Brazil; ⁵Neuroimaging Laboratory, Department of Neurology, University of Campinas, Campinas, Brazil; ⁶Department of Surgery, University of Campinas, Campinas, Brazil;

⁷Laboratory of Investigation in Metabolism and Diabetes, University of Campinas, Campinas, Brazil and ⁸Laboratory of Experimental Endocrinology, Department of Internal Medicine, University of Campinas, Campinas, Brazil. Correspondence: Dr LA Velloso, Department of Internal Medicine, University of Campinas, DCM FCM UNICAM, Campinas 13084-970 Sao Paulo, Brazil.

Email: lavelloso.unicamp@gmail.com Received 26 February 2015; revised 6 May 2015; accepted 17 May 2015; accepted article preview online 21 May 2015

INTRODUCTION

The hypothalamus has an important role in the control of whole-body energy homeostasis.^{1–3} In obesity, hypothalamic neurons are damaged by inflammatory signals triggered in response to dietary fats, resulting in defective control of caloric intake and energy expenditure.^{4–6} Adaptive thermogenesis is one of the physiological responses to increased caloric intake that can be affected by diet-induced hypothalamic inflammation.^{7–9} In rodents, uncoupled respiration in brown adipose tissue (BAT) accounts for a considerable fraction of thermogenesis and approaches aimed at increasing BAT activity can alleviate obese phenotypes.^{10,11}

Adult humans also have clusters of thermogenic active adipose cells characterized by a remarkably high uptake of glucose, which renders them easily detectable by (¹⁸F)-FDG PET scan.^{12–14} At first, based on their microscopic morphology and the expression of UCP1, it was proposed that these cells were collections of brown adipocytes.^{13,14} However, recent refinement of gene profiling and the extended characterization of its ontogeny resulted in the identification of a new type of tissue, named beige adipose tissue.¹⁵ A recent study has shown that both brown and beige adipocytes coexist in most humans.¹⁶

Because of the beneficial metabolic effects of increased BAT activity in experimental

models,¹⁷ it has been proposed that methods aimed at increasing the activity of brown/beige adipose tissue in humans could represent an interesting advance in the treatment of obesity and its comorbidities.^{18,19} This possibility has motivated the search for pharmacological approaches aimed at stimulating the activity of brown/beige adipocytes. In rodents, BAT is activated by increased sympathetic tonus.²⁰ Studies using a retrograde transsynaptic viral tracer identified ObRb-expressing neurons of the dorsomedial hypothalamus as the source of the sympathetic signals controlling BAT activity.²¹ However, in humans this is still a controversial issue.²² At least one study has shown that BAT of lean, but not obese subjects, can respond to pharmacological adrenergic stimulus.²³ Conversely, other studies failed to demonstrate its activation raising the suspicion that mechanisms other than hypothalamic-generated sympathetic signals regulate the activity of brown/beige adipocytes.^{24,25}

To further explore this question, we employed functional magnetic resonance imaging (fMRI) in parallel with (F 18) fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography (¹⁸F)-FDG PET/CT) scans and supraclavicular adipose tissue biopsies, to evaluate changes in hypothalamic and brown/ beige adipose tissue activity in response to cold. Our subjects included normal weight controls and obese subjects undergoing body mass reduction as an outcome of Roux-in-Y gastric bypass (RYGB). We show that although body mass reduction resulted in a significant increase in the number of patients presenting cold-induced activation of brown/beige adipose tissue, this phenomenon was not accompanied by a significant change in hypothalamic neuronal activity. Thus, during body mass reduction in obese humans, brown/beige adipose tissue and the hypothalamus are independently regulated in response to cold.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study evaluated 12 obese females selected from the Obesity Clinic at the University of Campinas and 12 lean female control volunteers selected from the students of the University. The obese, non-diabetes-diagnosed subjects²⁶ were included in the study after selection for bariatric surgery according to the standards of the National Institutes of Health Consensus Statement.²⁷ Figure 1a presents a flowchart depicting the process of patient selection. Details of the selection are presented as Supplementary Data. The study was approved by the University of Campinas Ethics Committee (293/2011).

Overview of the experimental procedure

Once included, patients were submitted to a detailed nutritional evaluation and oriented for all behavioral changes required for the success of the surgical procedure. During the following 2–6 weeks, the patients were submitted to additional anthropometric evaluations, blood collection, fMRI and whole-body (^{18}F)-FDG PET/CT scan. RYGB was always performed by the same surgeon who employed a technique previously described.²⁸ During the surgery, specimens of $\sim 2\text{ cm}^3$ were obtained from the abdominal subcutaneous and supraclavicular fat depots. The anatomical limits of the supraclavicular fat biopsy are depicted in Figure 1b. Approximately 8 months after surgery, the patients submitted to the same tests and procedures as before surgery. As surgical manipulation occurred only inside the abdomen during RYGB, we do not believe there could be any damage to the innervation of either abdominal or cervical adipose tissue that could interfere with the study. The lean controls submitted only once to a detailed nutritional and anthropometric evaluation followed by blood collection, (^{18}F)-FDG PET/ CT scan and fMRI.

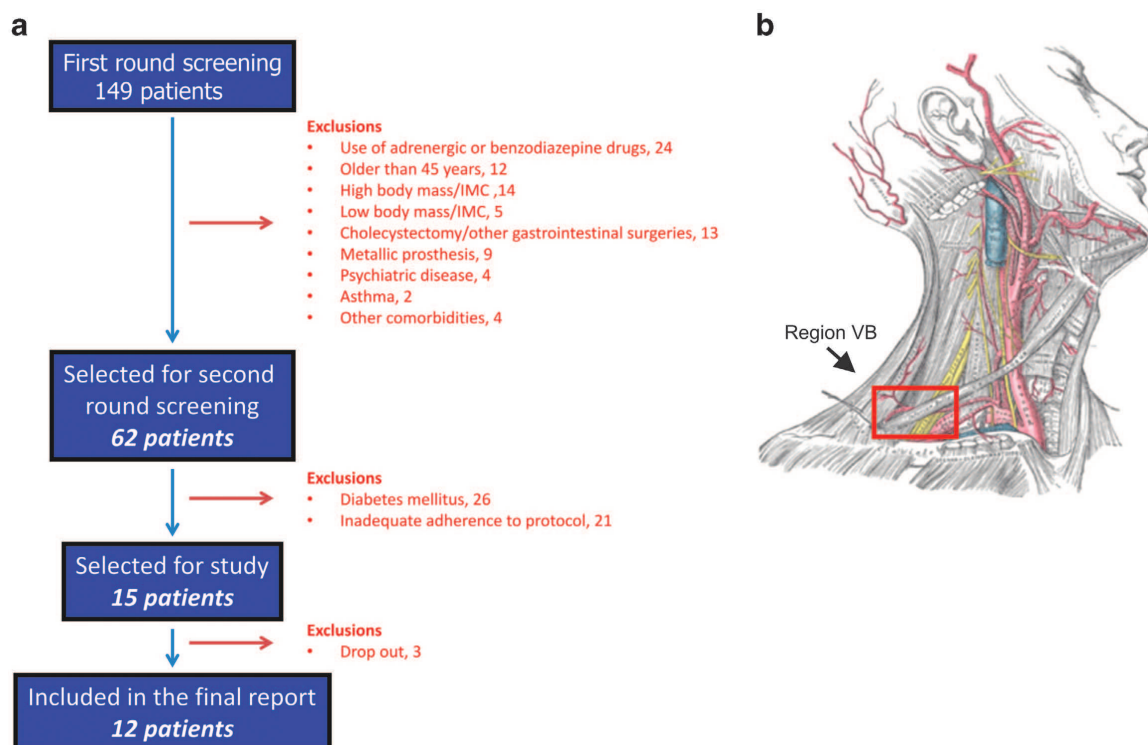


Figure 1. Flowchart of the study and the biopsy region in the supraclavicular area. (a) Flowchart of the study. (b) Cartoon depicting the neck region (VB) from where the fibro-adipose tissue was biopsied for detection of brown/beige adipose tissue markers by real-time PCR and immunofluorescence staining. Main image obtained from Wikimedia Commons (freely licensed media file repository).

Methods employed

Supplementary Data includes the complete descriptions of blood biochemistry and hormonal tests, fMRI, (^{18}F)-FDG PET/CT scan, real-time PCR,²⁹ histology and immunofluorescence staining.

Statistical analysis

(^{18}F)-FDG PET/CT scan, real-time PCR and fMRI studies, when comparing the means (and medians in real-time PCR) of the groups, we employed repeated-measure analysis of variance followed by Bonferroni post test. In fMRI studies, when comparing the means of signal intensity before and after cold exposure, we employed Student's t-test for paired samples. Fisher's exact test was employed to evaluate the activity of brown/beige adipose tissue, as determined by either (^{18}F)-FDG PET/CT scan or real-time PCR. Spearman's correlation rank was employed to determine the concordance between hypothalamic and brown/beige adipose tissue activity. In all analyses, the value of $P < 0.05$ was defined as statistically significant.

RESULTS

Body mass reduction resulted in changes in anthropometric and metabolic parameters

As expected, ~8 months after RYGB, the patients presented significant reductions of body mass/body mass index, waist and hip circumferences, plasma insulin and serum triglyceride levels (Supplementary Table S1). However, body mass/body mass index, and waist and hip circumferences were still significantly higher than the lean controls (Supplementary Table S1).

Increased brown/beige adipose tissue activity after body mass reduction

Figure 1 illustrates the procedure for patient selection (Figure 1a) and the region of neck where biopsies were performed for evaluation of brown/beige markers (Figure 1b). Figure 2 shows representative images of (^{18}F)-FDG PET/CT scans obtained from two obese subjects before and ~8 months after RYGB, and also from a lean control subject. As shown in Figure 3a, only 1 out of the 12 obese subjects was positive for brown/beige adipose tissue activity before surgery, whereas four turned into positive following body mass reduction. The obese

patient that scored positive before surgery remained positive after surgery. Concerning the lean controls, 5 out of 12 were positive for brown/beige adipose tissue activity at the time of the examination. To determine the significance of these records, we initially used Fisher's exact test to evaluate a contingency table prepared with the qualitative data of obese patients before surgery versus lean subjects and obese subjects after surgery versus lean subjects. Brown/beige adipose tissue positivity was higher in lean subjects as compared with obese patients before surgery ($P = 0.06$; odds ratio = 7.8). The comparison of obese patients after surgery versus lean subjects resulted in no significant difference ($P=0.50$; odds ratio = 1.42). In addition, we analyzed the quantitative data using analysis of variance, which confirmed the results (Figure 3a). Thus, although obese patients were significantly less capable of activating brown/beige adipose tissue on cold exposure, the body mass reduction following bariatric surgery resulted in an increased capacity to activate brown/beige adipose tissue, resulting in numbers similar to lean controls. As differences in core temperature could influence brown/beige adipose tissue activity, we evaluated glucose uptake by skeletal muscle, which also is affected by core temperature.^{30–32} As depicted in Figure 3b, no differences in gluteus muscle standardized uptake value were detected. This is in accordance with a recent study, which showed that there is no change in core temperature in humans exposed to at 18°C.³³ Figure 3c depicts images from (¹⁸F)-FDG PET/CT scans illustrating the region of the gluteus used to measure muscle standardized uptake value. As environmental temperature is a major factor regulating brown/beige adipose tissue activity, we included a graph depicting the mean temperatures in the region of Campinas, Brazil, during the time this study was carried out (Supplementary Figure S1) and the approximate date when each patient/control was submitted to the examination.

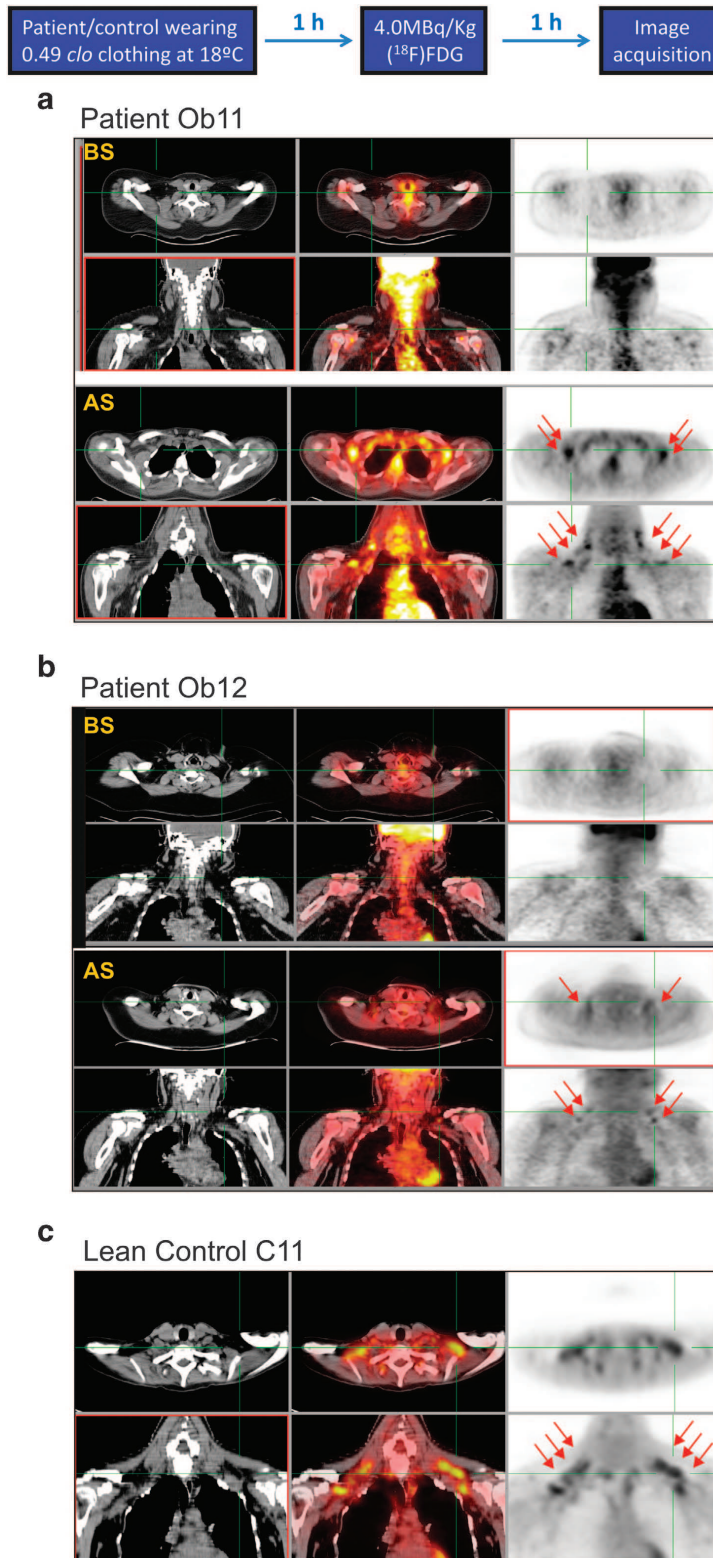


Figure 2. (^{18}F)-FDG PET/CT scans. The upper part of the figure depicts the flowchart of the protocol adopted for the procedure. The lower part of the figure depicts representative images obtained from the (^{18}F)-FDG PET/CT scans performed in patients Ob11 (a) and Ob12 (b), and lean control C11 (c). AS, after surgery; BS, before surgery. Red arrows depict regions with positive uptake for (^{18}F)-FDG.

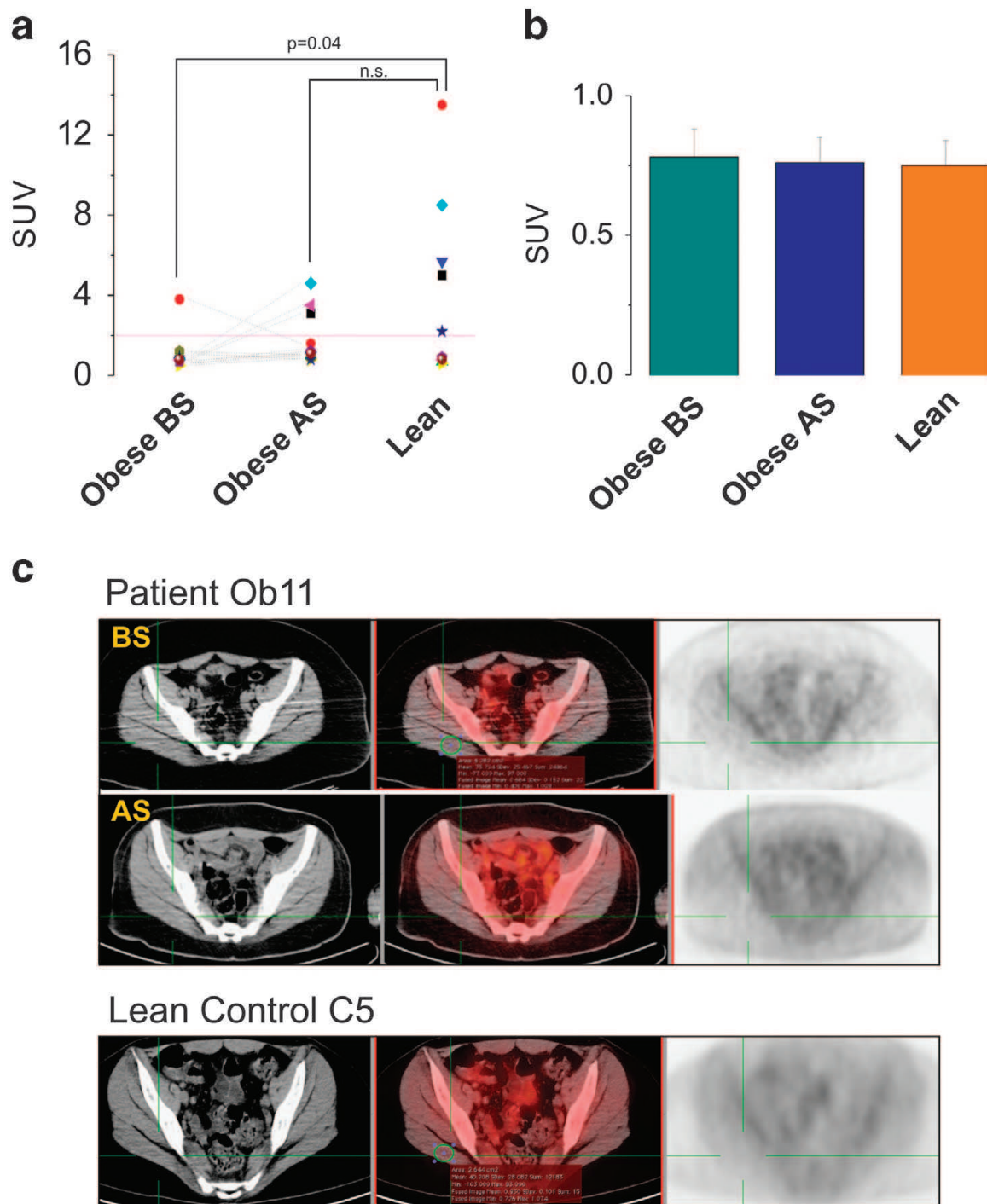


Figure 3. Brown/beige adipose tissue activity and skeletal muscle glucose uptake. (a) Maximal standardized uptake values (SUVs) reflecting supraclavicular brown/beige adipose tissue activity for each subject; the red line indicates SUV=2, the lower limit for positivity. (b) Mean SUVs for the gluteus muscle. (c) Representative images obtained from the (^{18}F)-FDG PET/CT scans performed in patient Ob11 and lean control C5, indicating the region selected for muscle SUV determination

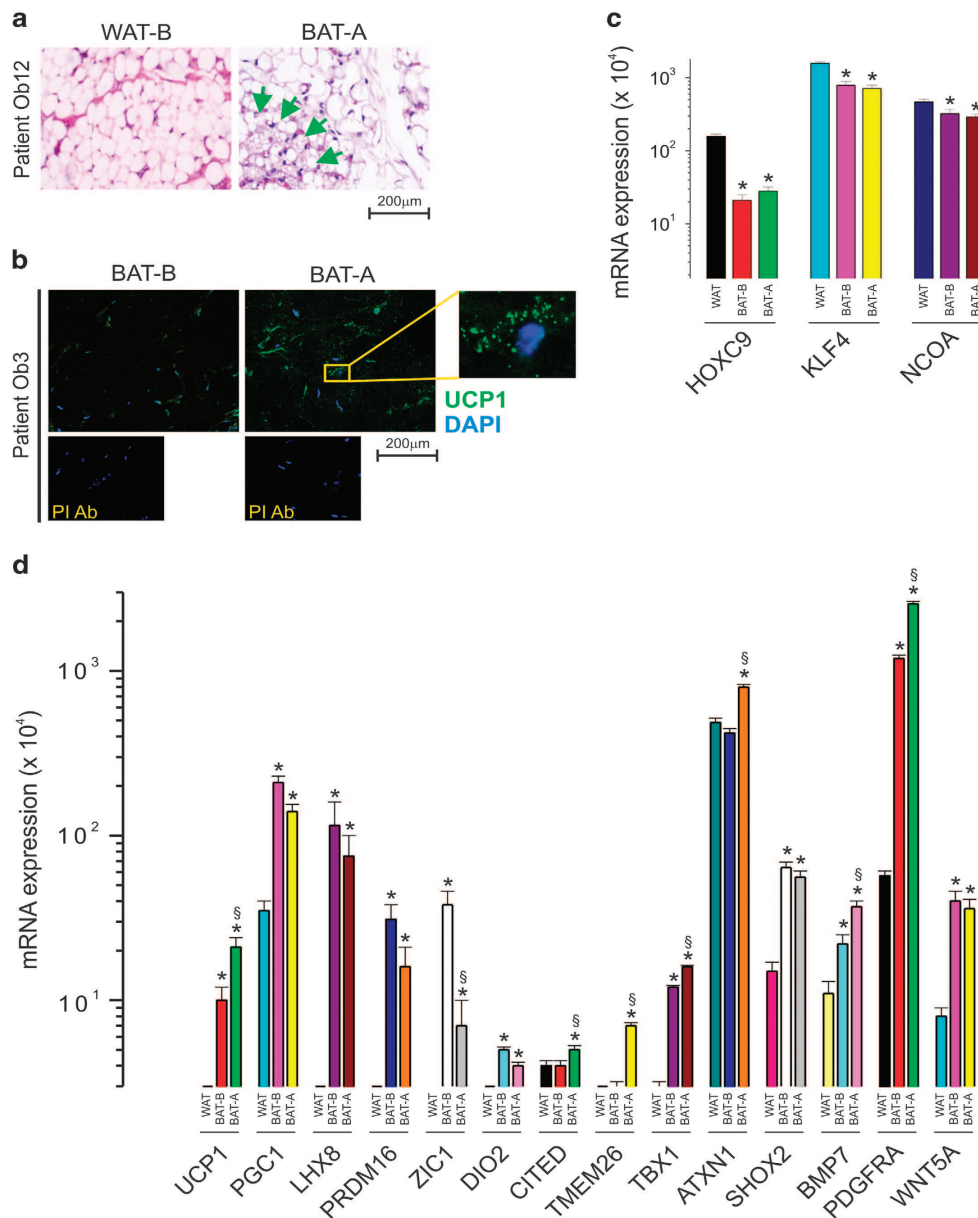


Figure 4. Expression of adipose tissue markers. (a and b) Five-micrometer sections obtained from abdominal wall (WAT-B) and supraclavicular adipose tissue (BAT-B and BAT-A) biopsies were employed for morphological evaluation following hematoxylin–eosin staining (a) and detection of UCP1 (green) by immunofluorescence staining (b); nuclei were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; blue) (b); in a, green arrows indicate cluster of cells with brown/beige adipocyte morphology; in b, panels at the bottom labeled PI-Ab are negative controls of the experiment on which samples were pre-incubated with a pre-immune antibody (PI-Ab). The means of mRNA expression of white (c) and brown/beige (d) adipose tissue mRNA markers were obtained from real-time PCR analysis in samples from the abdominal wall (WAT) or from the supraclavicular region, before surgery (BAT-B) or after surgery (BAT-A). Data are representative of 12 patients and are presented as the mean±s.e.m. In all, *Po0.05 versus WAT; §Po0.05 versus BAT-B. BAT-A, brown adipose tissue after surgery; BAT-B, brown adipose tissue before surgery; WAT-B, white adipose tissue from the

abdominal wall before surgery.

Body mass reduction results in increased expression of brown/ beige adipose tissue markers in supraclavicular adipose tissue

Tissue samples collected from the abdominal wall of obese patients during surgery exhibited only typical white adipocytes, whereas samples collected from the supraclavicular region exhibited clusters of adipocytes with a brown/beige phenotype surrounded by typical white adipocytes (Figure 4a). UCP1 could be detected by immunofluorescence staining in samples collected from the supraclavicular region, both before and after surgery (Figure 4b). Typically, UCP1 was detected at higher intensity of staining and in a larger number of cells in specimens collected after surgery, as compared with samples collected before surgery. No staining for UCP1 could be detected in samples from the abdominal wall (not shown). RNA samples were tested for the expression of a panel of adipocyte genes. In all patients, adipose tissue collected from the supraclavicular region tested positive for most of the brown/beige markers, whereas samples collected from the abdominal white adipose tissue tested negative or presented very low levels for most of the markers. White adipose tissue markers, HOXC9, KLF4 and NCOA, were predominantly expressed in the adipose tissue collected from the abdominal wall (Figure 4c). As depicted in Figure 4d, in samples from the supraclavicular region, UCP1, CITED, TMEM26, TBX1, ATXN1, BMP7 and PDGFRA underwent a significant increase following body mass reduction. Conversely, ZIC2 expression was significantly reduced following body mass reduction. For statistical analysis, we considered that BAT/beige adipose tissue scored positive when- ever four or more markers of BAT/beige tissue (UCP1, CITED, TMEM26, TBX1, ATXN1, BMP7 and PDGFRA) were detected in levels threefold or higher than the levels detected in white adipose. Using these data, we compared the presence of brown/ beige adipose tissue with the qualitative data obtained from the (^{18}F)-FDG PET/CT scans, scoring the patients as concordant when both PCR and (^{18}F)-FDG PET/CT scans presented similar results and discordant otherwise. A contingency table was constructed (Supplementary Table 2) and submitted to Fisher's exact test evaluation, which revealed that the methods coincided to detect the presence of brown/beige adipose tissue ($P = 0.50$).

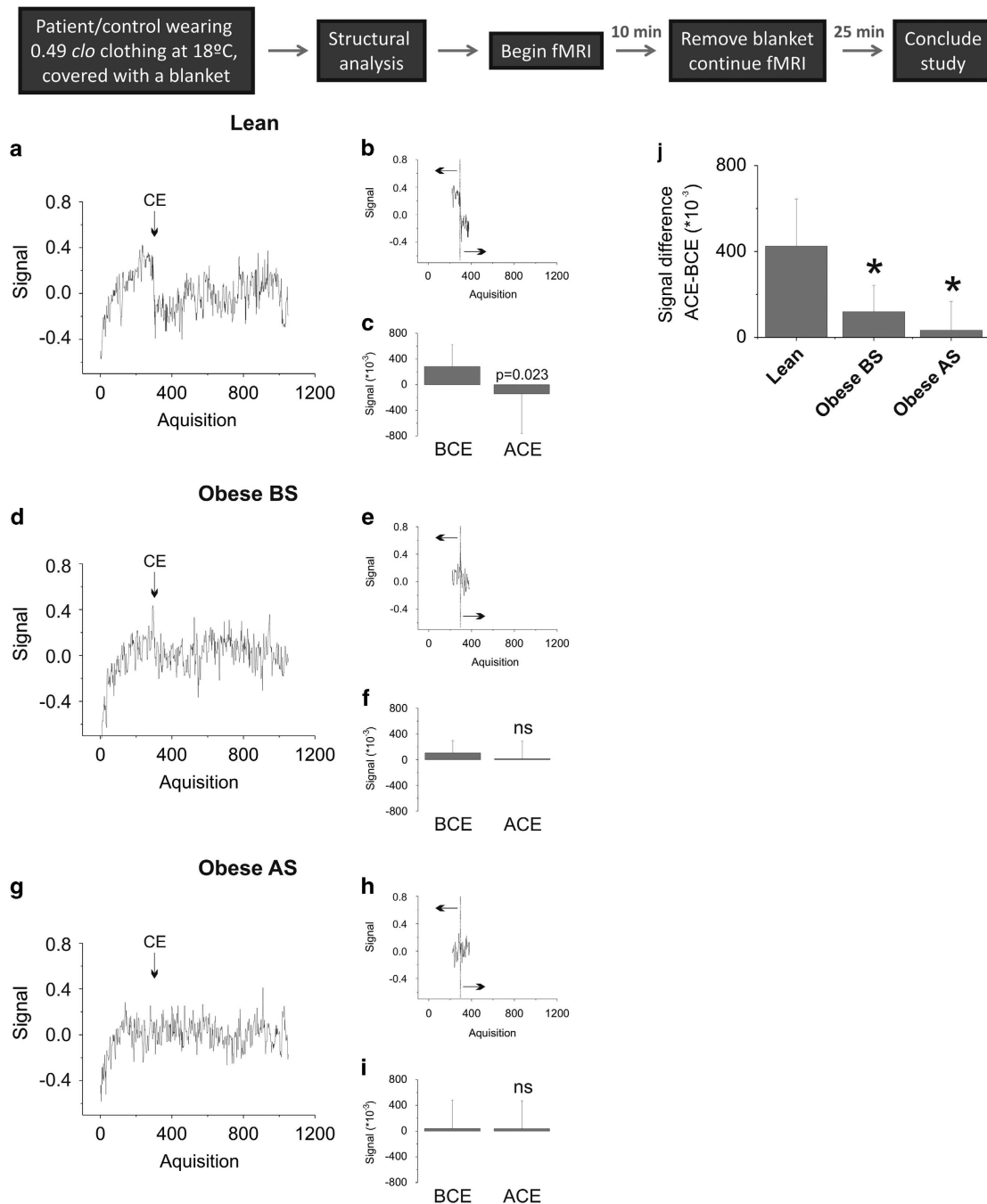


Figure 5. Temporal evaluation of hypothalamic neuronal function in response to cold exposure. The upper part of the figure depicts the flowchart of the protocol adopted for the procedure. Graphs A, D and G depict the mean variation of hypothalamic neuronal function as determined by fMRI. Graphs B, E and H present a detailed view of the mean variation of hypothalamic neuronal function during the 5 min that preceded and followed cold exposure; the vertical line represents the moment when cold exposure began; the arrows toward the left-hand side indicate the 5 min preceding cold exposure; the arrows toward the right-hand side indicate the 5 min following the beginning of cold exposure. Graphs C, F and I present the means of the signals during the 5 min that precede and follow cold exposure. Graph J presents the mean differences between hypothalamic neuron signal intensities before and after cold exposure. ACE, after cold exposure; AS, after surgery; BCE, before cold

exposure; BS, before surgery; CE, cold exposure. In J, * $P < 0.05$ versus lean.

No change in hypothalamic neuronal activity following body mass reduction

Immediately after exposure to cold, lean subjects presented an abrupt reduction in the signal detected during the fMRI temporal analysis of hypothalamic function (Figure 5a). For statistical purposes, we calculated the mean value of the signal during the 5 min that preceded the exposure to cold and during the 5 min subsequent to the beginning of cold exposure. A detailed view of the period used to calculate the means of the signal is shown in Figure 5b. A comparison of the means of the signal before and after cold exposure confirmed the significance of the change (Figure 5c). Employing the same method as described above for lean subjects, we evaluated the hypothalamic signal intensity in the obese subjects before surgery. As depicted in Figure 5d, there was no change in signal intensity after the exposure to cold. Again, we calculated the means of signal intensity before and after cold exposure (Figure 5e) and submitted the means to statistical analysis. As revealed in Figure 5f, the obese subjects before surgery presented no significant change in their hypothalamic response to cold. Approximately 8 months after bariatric surgery, the obese patients submitted to a second round of fMRI. As shown in Figure 5g, there was no apparent change in the hypothalamic responsiveness to cold. This was confirmed by calculating the means of the signals before and after cold exposure (Figure 5h), and submitting them to statistical analysis (Figure 5i). The mean change in signal intensity caused by cold exposure was significantly greater in lean subjects as compared with that in obese subjects, either before or after body mass reduction (Figure 5j). The approximate dates when patients and controls performed the fMRIs are shown in a graph depicting the environmental temperatures during the period of the study (Supplementary Figure 2).

No correlation between hypothalamic and brown/beige adipose tissue activity in response to cold

Qualitative and quantitative analysis were employed to evaluate the putative correlation between hypothalamic and brown/beige adipose tissue activity in response to cold. Initially, based on the magnitude of change in the fMRI signal intensity in the hypothalamus, subjects were scored either positive or negative for cold-induced activation of hypothalamic neurons. As depicted in Supplementary Table 3, three patients scored positive before surgery and four

scored positive after surgery; only two patients that scored positive before surgery maintained positivity after surgery. In addition, correlation analysis comparing brown/beige adipose tissue activity as determined by the (^{18}F)-FDG PET/CT scans and hypothalamic responsiveness to cold revealed no significance for either group: obese before surgery ($r=0.32$, $P=0.30$), obese after surgery ($r=-0.04$, $P=0.89$), or lean ($r=0.33$, $P=0.29$) (Figure 6).

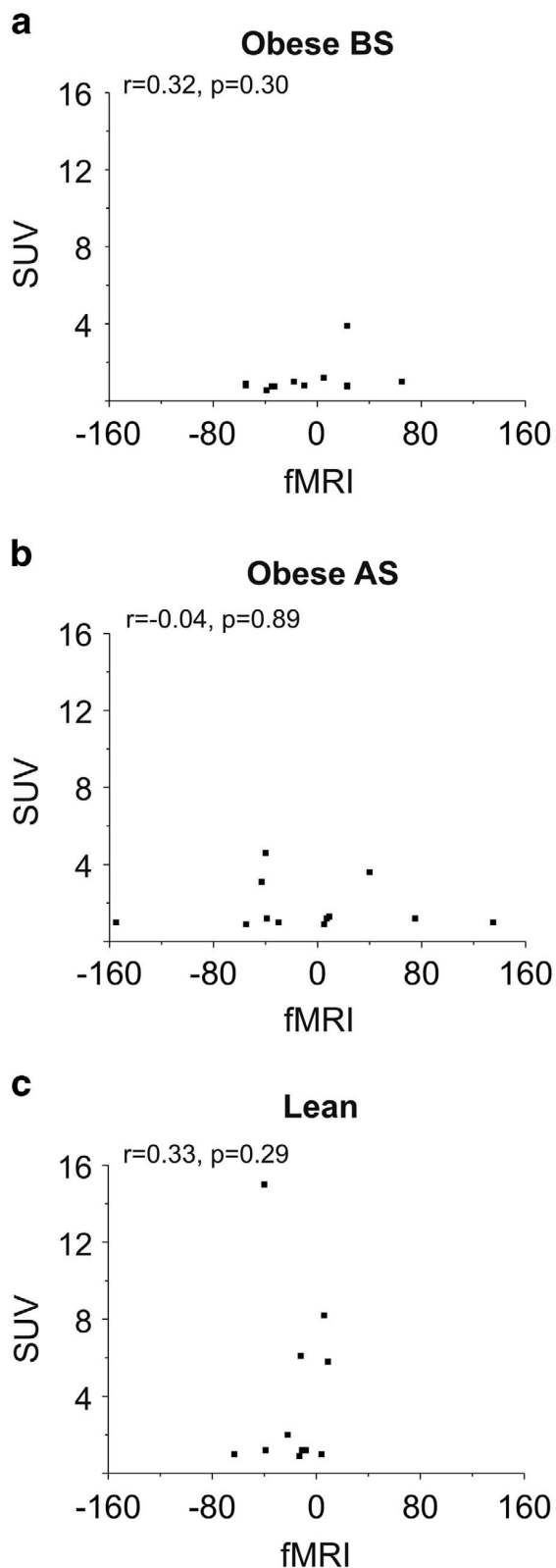


Figure 6. Absence of correlation between brown/beige adipose tissue activity and hypothalamic response to cold. Standardized uptake value obtained in (^{18}F)-FDG PET/CT scans (SUV) is plotted against the change in fMRI signal intensity, as determined by BOLD signal variation 5 min before and 5 min after cold exposure. AS, after surgery; BS, Before surgery

DISCUSSION

The recent identification of brown/beige adipose tissue in adult humans^{12–14} has motivated the search for methods of increasing its activity as an alternative approach to bariatric surgeries to treat obesity and its comorbidities.^{18,34} Because of its similarity with rodent BAT, which is under sympathetic control, sympathomimetic drugs were interesting candidates; however, at least two recent studies were unable to demonstrate the activation of human brown/beige adipose tissue by different β -adrenergic drugs.^{24,25} Vosselman et al.²⁴ treated lean subjects with the non-selective β -adrenergic agonist, isoprenaline, and compared its effects with cold exposure. Although isoprenaline was capable of increasing metabolic activity to levels similar to cold exposure, this outcome was not correlated with increased brown/beige adipose tissue activity.²⁴ Likewise, Cypess et al.²⁵ employed another non-selective adrenergic drug, ephedrine, which reproduced some of the outcomes of cold exposure, but again failed to stimulate brown/beige activity. Nevertheless, the importance of adrenergic activity to control human brown/beige adipose tissue is demonstrated by the fact that the non-specific β -blocker, propranolol, is capable of reducing glucose uptake by adipose tissue during (¹⁸F)-FDG PET/CT scans^{35,36} and by a study on which ephedrine was capable of inducing BAT activity in lean, but not obese subjects.²³

Several hypotheses have been proposed to explain this seemingly discordant data: one possibility is that the systemic levels obtained by the administration of sympathomimetic drugs are not sufficient to reach the synaptic concentration required to activate brown/beige adipose tissue in humans.²⁵ Another possibility is that during drug-induced brown/beige adipose tissue thermogenesis, free fatty acids rather than glucose may be the preferred substrate, making the uptake of (¹⁸F)-FDG a non-optimal method for this evaluation.²⁴ In addition, as signature genes for both brown and beige adipose tissues can coexist in the supraclavicular region of humans,¹⁶ it could be that the brown component is responsive to β -adrenergic stimulation, whereas the beige component is not, rendering the methods currently used insufficient to detect small changes in thermogenic activity.

Considering that at least part of the cold-induced thermogenic activity of human brown/beige adipose tissue is under sympathetic control, the most obvious origin for the innervating fibers would be the hypothalamus.^{20,21} Development of neuroimaging methods has provided the means to reliably study the structure and function of the human hypothalamus.^{37,38} At least

two recent studies have shown changes in hypothalamic structure and function in human obesity.^{39,40} On body mass reduction, only part of the hypothalamic defect in response to a nutrient stimulus is recovered,³⁹ suggesting that, as in experimental animals,⁴⁻⁶ obese humans have severe and perhaps only partially reversible damage to the hypothalamic neurons involved in the control of whole-body energy homeostasis.

In the present study, we hypothesized that if the activity of the brown/beige adipose tissue were under hypothalamic control, changes in brown/beige adipose tissue occurring as a result of body mass reduction would be paralleled by changes in hypothalamic function. To test this hypothesis, we used an fMRI protocol developed for the evaluation of brain functionality in response to glucose,³⁸ which was recently adapted for the evaluation of changes in hypothalamic activity in obese subjects.³⁹ Here, instead of using a nutrient stimulus, we acutely exposed the subjects to a cold environment. The results obtained from the fMRI studies were then compared with brown/beige adipose tissue activity evaluated by (¹⁸F)-FDG PET/CT scans and with the expression of signature genes in biopsies from the supraclavicular fat depot.

Concerning the hypothalamus, we showed that lean but not obese subjects present a significant change in the cold-induced neuronal activity that occurs few seconds after exposure to a reduced environmental temperature. Although we have no knowledge of previous studies that evaluated the time course of changes in neuronal activity in humans exposed to cold, experimental animals submitted to low environmental temperatures present a rapid increase in c-fos expression in the hypothalamus, thus providing strong support for the existence of an immediate communication pathway between peripheral thermosensors and hypothalamic neurons.⁴¹ In addition, we showed that following body mass reduction, the hypothalamic activity in response to cold is not significantly modified. If this were true for the majority of obese humans undergoing body mass reduction, it means that an important mechanism involved in the control of whole-body energy homeostasis could be severely and, perhaps, irreversibly damaged in obesity. Interestingly, the responsiveness of hypothalamic neurons to glucose, which is also affected in obesity,³⁹ is at least in part recovered after body mass reduction. Thus, we suggest that obesity affects neurons that are involved in the response to nutrients and to cold stimulus differently. There are two methodological issues that deserve additional comments. First, it is worth mentioning that the fMRI signals in subjects responding to cold stimulus underwent a negative variation. fMRI detects the signals

produced by changes in the blood oxygen levels. The increasing firing rate of neurons increases the demand for oxygen, thus leading to vasodilation, which results in increased regional concentration of oxyhemoglobin. In the hypothalamus, there are distinct subpopulations of neurons that control thermogenesis. NPY/AgRPergic neurons fire to reduce thermogenesis, whereas POMC/CARTergic neurons fire to increase thermogenesis. We believe that the negative signal we detect in responsive subjects is due to the net result between activation and inactivation of these distinct subpopulations, prevailing the inhibition of firing of NPY/AgRPergic neurons and thus producing a negative fMRI signal. This brings us to the second issue, which refers to the spatial resolution of the method. Images were acquired to generate 3-mm voxels. This is expected to provide a resolution of about 1 cm. As the human hypothalamus is $\sim \text{cm}^3$ large, the resolution of our fMRI allows for the detection of signals in the whole hypothalamus and not in specific nuclei. In the future, increased resolution of the method may allow for the definition of regions on which neurons are stimulated and regions on which neurons are inhibited by cold exposure.

Different from the hypothalamus, brown/beige adipose tissue activity, which was reduced in obese subjects as compared with that in lean subjects, presented a significant recovery after body mass reduction. Our results match the recently published data of Vijgen et al.,⁴² who evaluated 10 obese patients submitted to laparoscopic gastric banding surgery. Before the surgery, only two patients showed brown/beige adipose tissue activity, whereas five patients scored positive 1 year after the procedure.

In addition to (^{18}F)-FDG PET/CT scans, we also evaluated the presence of brown/beige adipose tissue by the measurement of brown and beige adipose tissue signature gene expression in biopsies of supraclavicular fat. As previously reported,^{16,43} we detected the presence of both classical BAT genes and some of the recently identified beige adipose tissue-specific genes. It is noteworthy that 7 out of 14 brown/beige mRNAs tested underwent significant increase following body mass reduction. However, both beige specific (TMEM and TBX1) and non-specific (UCP1, CITED, ATXN1, BMP7 and PDGFRA) mRNAs increased, suggesting that the depots of thermogenic adipocytes that can be stimulated on cold exposure and are recruited during body mass reduction are composed of both brown and beige cells.

The main objective of this study was to evaluate whether changes in the activity of

brown/beige adipose tissue in response to cold would be accompanied by changes in the activity of hypothalamic neurons. We did not observe a significant correlation between subjects presenting increased brown/beige adipose tissue activity and hypothalamic responsiveness to cold in any group. In the obese group, this discordance was reinforced by the fact that after body mass reduction, there was an increase in the number of subjects presenting detectable brown/beige adipose tissue but no significant change in hypothalamic function. In the lean group, both brown/beige adipose tissue and hypothalamic activity were stimulated by cold exposure; however, no correlation was found between subjects presenting increased brown/beige adipose tissue and significant changes in hypothalamic activity. A recent study has shown that in lean, but not obese subjects, glucose metabolism in other regions of the brain, such as amygdala, occipital cortex and cerebellum, can be associated with increased BAT activity.⁴⁴ Taken together, the results of the present study and the study by Orava et al.⁴⁴ may suggest that either brown/beige adipose tissue is not under the control of the central nervous system or it is under the control of regions other than the hypothalamus.

In conclusion, this study demonstrates that obese subjects present a defective hypothalamic response to cold stimulation that is not recovered after body mass reduction. In addition, we did not detect any sign of connectivity between brown/beige adipose tissue and the hypothalamus, either in lean or in obese subjects.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank E. Roman and G. Ferraz from the University of Campinas for technical assistance. Support for the study was provided by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and grants from the Trust in Science Initiative from Glaxo-Smithkline, UK. The Laboratories of Cell Signaling and Experimental Endocrinology belong to the Obesity and Comorbidities Research Center and the National Institute of Science and Technology–Diabetes and Obesity.

REFERENCES

- . 1 Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 2006; 443: 289–295.
- . 2 Zeltser LM, Seeley RJ, Tschop MH. Synaptic plasticity in neuronal circuits regulating energy balance. *Nat Neurosci* 2012; 15: 1336–1342.
- . 3 Dietrich MO, Horvath TL. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 2013; 36: 65–73.
- . 4 Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* 2011; 35: 1455–1465.
- . 5 Thaler JP, Guyenet SJ, Dorfman MD, Wisse BE, Schwartz MW. Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes* 2013; 62: 2629–2634.
- . 6 Cai D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases. *Trends Endocrinol Metab* 2013; 24: 40–47.
- . 7 Cannon B, Nedergaard J. Metabolic consequences of the presence or absence of the thermogenic capacity of brown adipose tissue in mice (and probably in humans). *Int J Obes* 2010; 34: S7–S16.
- . 8 Romanatto T, Roman EA, Arruda AP, Denis RG, Solon C, Milanski M et al. Deletion of tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) protects against diet-induced obesity by means of increased thermogenesis. *J Biol Chem* 2009; 284: 36213–36222.
- . 9 Arruda AP, Milanski M, Velloso LA. Hypothalamic inflammation and thermogenesis: the brown adipose tissue connection. *J Bioenerg Biomembr* 2011; 43: 53–58.
- . 10 Hamann A, Flier JS, Lowell BB. Decreased brown fat markedly enhances susceptibility to diet-induced obesity, diabetes, and hyperlipidemia. *Endocrinology* 1996; 137: 21–29.
- . 11 Kong D, Tong Q, Ye C, Koda S, Fuller PM, Krashes MJ et al. GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. *Cell (Lond)* 2012; 151: 645–657.
- . 12 van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 2009; 360: 1500–1508.
- . 13 Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009; 360: 1509–1517.
- . 14 Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 2009; 360: 1518–1525.
- . 15 Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 2012; 150: 366–376.
- . 16 Jespersen NZ, Larsen TJ, Peijs L, Dagaard S, Homoe P, Loft A et al. A classical brown adipose tissue mRNA signature partly overlaps with brite in the supraclavicular region of adult humans. *Cell Metab* 2013; 17: 798–805.
- . 17 Almind K, Manieri M, Sivitz WI, Cinti S, Kahn CR. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2366–2371.
- . 18 Cypess AM, Kahn CR. Brown fat as a therapy for obesity and diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010; 17: 143–149.

- . 19 Lidell ME, Enerback S. Brown adipose tissue--a new role in humans? *Nat Rev Endocrinol* 2010; 6: 319–325.
- . 20 Nakamura K, Morrison SF. Central efferent pathways mediating skin cooling- evoked sympathetic thermogenesis in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: R127–R136.
- . 21 Zhang Y, Kerman IA, Laque A, Nguyen P, Faouzi M, Louis GW et al. Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. *J Neurosci* 2011; 31: 1873–1884.
- . 22 Bartness TJ, Vaughan CH, Song CK. Sympathetic and sensory innervation of brown adipose tissue. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34: S36–S42.
- . 23 Carey AL, Formosa MF, Van Every B, Bertovic D, Eikelis N, Lambert GW et al. Ephedrine activates brown adipose tissue in lean but not obese humans. *Diabetologia* 2013; 56: 147–155.
- . 24 Vosselman MJ, van der Lans AA, Brans B, Wierdsma R, van Baak MA, Schrauwen P et al. Systemic beta-adrenergic stimulation of thermogenesis is not accompanied by brown adipose tissue activity in humans. *Diabetes* 2012; 61: 3106–3113.
- . 25 Cypess AM, Chen YC, Sze C, Wang K, English J, Chan O et al. Cold but not sympathomimetics activates human brown adipose tissue in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 10001–10005.
- . 26 American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes–2011. *Diabetes Care* 2011; 34: S11–S61.
- . 27 Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 615S–619S.
- . 28 de Carvalho CP, Marin DM, de Souza AL, Pareja JC, Chaim EA, de Barros Mazon S et al. GLP-1 and adiponectin: effect of weight loss after dietary restriction and gastric bypass in morbidly obese patients with normal and abnormal glucose metabolism. *Obes Surg* 2009; 19: 313–320.
- . 29 Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA et al. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* 2012; 61: 1455–1462.
- . 30 Bell AW, Gardner JW, Manson W, Thompson GE. Acute cold exposure and the metabolism of blood glucose, lactate and pyruvate, and plasma amino acids in the hind leg of the fed and fasted young ox. *Br J Nutr* 1975; 33: 207–217.
- . 31 Vallerand AL, Frim J, Kavanagh MF. Plasma glucose and insulin responses to oral and intravenous glucose in cold-exposed humans. *J Appl Physiol* 1988; 65: 2395–2399.
- . 32 Gasparetti AL, de Souza CT, Pereira-da-Silva M, Oliveira RL, Saad MJ, Carneiro EM et al. Cold exposure induces tissue-specific modulation of the insulin-signalling pathway in *Rattus norvegicus*. *J Physiol* 2003; 552: 149–162.
- . 33 Ouellet V, Labbe SM, Blondin DP, Phoenix S, Guerin B, Haman F et al. Brown adipose tissue oxidative metabolism contributes to energy expenditure during acute cold exposure in humans. *J Clin Invest* 2012; 122: 545–552.
- . 34 Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med* 2013; 19: 1252–1263.
- . 35 Parysow O, Mollerach AM, Jager V, Racioppi S, San Roman J, Gerbaudo VH. Low-dose oral propranolol could reduce brown adipose tissue F-18 FDG uptake in patients undergoing PET scans. *Clin Nucl Med* 2007; 32: 351–357.

- . 36 Soderlund V, Larsson SA, Jacobsson H. Reduction of FDG uptake in brown adipose tissue in clinical patients by a single dose of propranolol. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007; 34: 1018–1022.
- . 37 De Araujo IE, Rolls ET. Representation in the human brain of food texture and oral fat. *J Neurosci* 2004; 24: 3086–3093.
- . 38 Liu Y, Gao JH, Liu HL, Fox PT. The temporal response of the brain after eating revealed by functional MRI. *Nature* 2000; 405: 1058–1062.
- . 39 van de Sande-Lee S, Pereira FR, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR et al. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes* 2011; 60: 1699–1704.
- . 40 Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 2012; 122: 153–162.
- . 41 McKittrick DJ. Expression of fos in the hypothalamus of rats exposed to warm and cold temperatures. *Brain Res Bull* 2000; 53: 307–315.
- . 42 Vijgen GH, Bouvy ND, Teule GJ, Brans B, Hoeks J, Schrauwen P et al. Increase in brown adipose tissue activity after weight loss in morbidly obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E1229–E1233.
- . 43 Lidell ME, Betz MJ, Enerback S. Two types of brown adipose tissue in humans. *Adipocyte* 2014; 3: 63–66.
- . 44 Orava J, Nummenmaa L, Nojonen T, Viljanen T, Parkkola R, Nuutila P et al. Brown adipose tissue function is accompanied by cerebral activation in lean but not in obese humans. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34: 1018–1023.

CONCLUSÃO

O método de fMRI utilizado neste estudo permitiu a determinação de uma resposta funcional do hipotálamo frente a exposição ao frio. Esta resposta é significativa em indivíduos magros, sendo perdida em obesos mesmo após a redução de massa corporal subsequente a cirurgia bariátrica. A atividade do tecido adiposo marrom em resposta ao frio é maior em indivíduos magros que em obesos. Entretanto, há aumento significativo desta atividade em obesos após a redução da massa corporal. Com os métodos utilizados neste estudo não foi possível identificar sinais de conectividade entre o hipotálamo e o tecido adiposo marrom em resposta ao frio.

I. LISTA DOS RNA_m TESTADOS

	<i>Assay #</i>	<i>Manufacturer</i>
WAT Genes		
HOXC9	Hs.PT.58.19102989	Integrated DNA Technologies
KLF4	Hs.PT.58.45737104	Integrated DNA Technologies
NCOA	Hs.PT.58.25944909	Integrated DNA Technologies
BAT/Beige Genes		
UCP1	Hs00222453_m1	Life Technologies
PGC1A	Hs01016719_m1	Life Technologies
LHX8	Hs00418293_m1	Life Technologies
PRDM16	Hs00922674_m1	Life Technologies
ZIC1	Hs00602749_m1	Life Technologies
DIO2	Hs00988260_m1	Life Technologies
CITED	Hs00918445_g1	Life Technologies
TMEM26	Hs.PT.58.2178812	Integrated DNA Technologies
TBX1	Hs.PT.58.2672803	Integrated DNA Technologies
ATXN1	Hs.PT.58.2027543	Integrated DNA Technologies
SHOX2	Hs.PT.58.1692683	Integrated DNA Technologies
BMP7	Hs.PT.56a.38681151	Integrated DNA Technologies
PDGFRA	Hs.PT.58.45699973	Integrated DNA Technologies
WNT5A	Hs.PT.58.22221435	Integrated DNA Technologies

II. ANTROPOMETRIA E BIOQUÍMICA DOS OBESOS PRÉ E PÓS CIRURGIA E CONTROLES


	Obese		Lean
	<i>Before Surgery</i>	<i>After Surgery</i>	
Age	30±5	31±5	30±6
Bodymass (Kg)	112±7	80±9*	55.5±5*§
BMI (kg/m ²)	43±2.8	31±3*	21±2*§
WC (cm)	131±8	103±12*	73±6*§
HC (cm)	136±9	110±10*	90±8*§
Glucose (mg/dL)	83±6	74±7	78±8
Insulin (μUI/mL)	12.1±11	4.4±2.4*	4.1±1.3*
HbA1c (%) (HPLC)	5.5±0.3	5.1±0.4	5.1±0.2
ESR (mm/1h)	23±11	19±12	12±11
hsCRP (mg/dL)	0.87±0.3	0.98±0.6	0.31±0.3*§
Cholesterol (mg/dL)	203±28	151±23	180±36
HDL (mg/dL)	44±7	47±11	58±6
LDL (mg/dL)	128±27	89±19	100±28
Triglycerides (mg/dL)	153±10	71±19*	101±52
AST (U/L)	18.2±4	15.7±5	15.8±4
ALT (U/L)	18.3±5	17.5±5	16.9±8
AP (U/L)	75±19	77±27	48±15
GGT (U/L)	25±10	30±7	15±6
Uricacid (mg/dL)	5.1±1.2	4.2±0.7	4.0±0.9
Urea (mg/dL)	28±5	27±8	28±6
Creatinine (mg/dL)	0.67±0.1	0.64±0.1	0.74±0.1

III. RESPOSTA HIPOTALÂMICA AO FRIO

Patients			Lean Controls	CHA
	CHA BeforeSurgery	CHA AfterSurgery		
OB1	Negative	Negative	C1	Positive
OB2	Negative	Positive	C2	Positive
OB3	Negative	Positive	C3	Positive
OB4	Positive	Negative	C4	Negative
OB5	Negative	Negative	C5	Positive
OB6	Negative	Negative	C6	Positive
OB7	Negative	Positive	C7	Negative
OB8	Negative	Negative	C8	Negative
OB9	Positive	Positive	C9	Negative
OB10	Negative	Negative	C10	Negative
OB11	Positive	Negative	C11	Positive
OB12	Negative	Negative	C12	Positive

C1-C12, lean controls; OB1-OB12, obese patients; CHA, cold-induced hypothalamic activity.

IV. APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA MÉDICA

 UNICAMP	FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa
CEP, 09/06/11 (Grupo III)	
PARECER CEP: Nº 293/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto). CAAE: 0237.0.146.000-11	
I - IDENTIFICAÇÃO:	
PROJETO: "O TECIDO ADIPOSEO MARROM EM HUMANOS - CONEXÕES FUNCIONAIS COM O HIPOTÁLAMO, COM A AÇÃO DA INSULINA E ÁCIDOS BILIARES". PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Daniel Minutti de Oliveira INSTITUIÇÃO: Hospital de Clínicas/UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 13/04/2011 APRESENTAR RELATÓRIO EM: 09/06/12 (O formulário encontra-se no site acima).	
II – OBJETIVOS.	
Avaliar (por meio de PET-CT, RM funcional hipotalâmica, clampeuglicêmico-hiperinsulinêmico e biópsia de tecido adiposo branco e marrom), o impacto da redução de peso após cirurgia bariátrica na atividade do tecido adiposo marrom, bem como a relação entre este tecido, atividade hipotalâmica e resistência à insulina.	
III – SUMÁRIO.	
Serão estudados vinte e cinco pacientes com IMC>40kg/m2, submetidos a cirurgia bariátrica. As avaliações de imagem serão obtidas no início e no fim do período de acompanhamento e serão acompanhadas de RM funcional para avaliação da atividade hipotalâmica, clamp euglicêmico-hiperinsulinêmico para avaliação da resistência à insulina, e biópsia de tecido adiposo branco e marrom (para análise de expressão de TGR5 e deiodinase 2). Os pacientes serão comparados a dez voluntários pareados por idade e gênero, com IMC<25, os quais serão submetidos apenas a uma avaliação. Espera-se com estudo obter avanços na caracterização da presença e atividade do tecido adiposo marrom em diferentes grupos de indivíduos, que pode estar associada à gênese de obesidade. Os autores admitem a presença de alguns riscos e desconfortos envolvidos nos procedimentos; todavia, garantem todos os recursos cabíveis para preveni-los ou minimizá-los, eficientemente.	
IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.	
Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	
V - PARECER DO CEP.	
<hr/> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126 Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP </div> <div style="text-align: right;"> FONE (019) 3521-8936 FAX (019) 3521-7187 cep@fcm.unicamp.br </div> </div>	



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

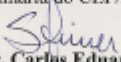
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na IV Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de abril de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

V. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

O tecido adiposo marrom em humanos – conexões funcionais com o hipotálamo, com a ação da insulina e ácidos biliares

O(A) Sr(a). está sendo convidado(a) a fazer parte de um estudo de pesquisa, conduzido pela Dra. Briana Rachid, Dr. Daniel Minutti, Dra. Carolina de Souza, Dr. Licio A. Velloso, Dr. Mario Saad, Dr. Bruno Geloneze e outros pesquisadores. Este termo de consentimento tem o objetivo de fornecer informações sobre o estudo que está sendo proposto e sobre os possíveis riscos relacionados.

Leia este termo de consentimento atentamente e, se tiver alguma dúvida, peça explicações ao médico ou a alguém da equipe do estudo. Se concordar em participar do estudo e autorizar o uso e divulgação das informações obtidas durante o estudo, assine a última página deste termo de consentimento.

Objetivo do estudo

O objetivo deste estudo é avaliar a atividade de um tipo específico de gordura, chamada gordura marrom, em indivíduos obesos comparando-os com indivíduos de peso normal, e se esta atividade se modifica após a perda de peso decorrente da cirurgia bariátrica. Sua participação nos ajudará no entendimento dos mecanismos que levam à obesidade. Os progressos nos tratamentos das doenças necessitam de estudos como este, por isso sua participação é muito importante.

Procedimentos do estudo

Serão feitas algumas perguntas sobre a sua saúde e a sua dieta. Serão verificados: pressão arterial, peso, altura e circunferência abdominal.

Você deverá comparecer em dias agendados, em jejum de 12 horas, para a realização dos seguintes exames:

- Clampeuglicêmico-hiperinsulinêmico: serão puncionadas duas veias no antebraço, uma para coleta de amostras de sangue, e a outra para infusão de glicose e insulina. Este exame terá a duração de 5 horas.
- Ressonância Magnética do crânio: O exame será realizado em uma sala com temperatura entre 16 e 18 graus. Durante o exame, você usará apenas trajes de banho, com um cobertor nos primeiros 10 minutos de aquisição das imagens. O cobertor será retirado e o exame continuará por mais 25 minutos.
- Tomografia por emissão de pósitrons (PET): você deverá comparecer bem agasalhado e com trajes de banho por baixo da roupa. Você ficará em uma sala, em trajes de banho, com temperatura de 16 graus por 2 horas. Será puncionada uma veia para infusão de ^{18}F -FDG (glicose ligada a flúor radioativo). O exame será iniciado e terá duração de aproximadamente 40 minutos.
- Biópsia de tecido adiposo branco e marrom: será realizada uma pequena incisão sob anestesia local no abdome e na região em que for localizado tecido adiposo marrom através da PET, para retirada de um fragmento de gordura branca e gordura marrom.
- Exames laboratoriais: Uma veia do antebraço será puncionada e será colhida uma amostra de sangue.
- Calorimetria indireta: você ficará deitado, imóvel em uma maca por cerca de 60 minutos, respirando com uma máscara envolvendo nariz e boca.

Todos os procedimentos serão realizados duas vezes no grupo de pacientes obesos (antes da cirurgia e oito meses depois da cirurgia) e uma única vez no grupo de pacientes com peso normal.

Pela sua participação, você não receberá qualquer valor em dinheiro, da mesma forma que não terá qualquer despesa com o que for necessário para o estudo.

Possíveis efeitos indesejáveis

Pode haver desconforto causado pela coleta de amostras de sangue. Os riscos possíveis relacionados à coleta de sangue são inflamação da veia, dor, manchas roxas na pele ou sangramento no local. A infusão de insulina no clampeuglicêmico-hiperinsulinêmico não

oferece risco de hipoglicemia (açúcar baixo no sangue), porque os seus níveis de glicose serão avaliados frequentemente e a infusão de glicose será regulada para manter os níveis constantes no sangue. Não existem riscos previstos para a Ressonância Magnética. Você poderá eventualmente sentir algum desconforto por ter de ficar imóvel por vários minutos, durante a aquisição das imagens. A tomografia por emissão de pósitrons é um exame não invasivo, porém existe exposição à radiação, que é semelhante à radiação de um exame de tomografia computadorizada comum. A temperatura reduzida das salas de exame pode trazer desconforto transitório. A biópsia de tecido adiposo pode provocar dor e desconforto, sangramento no local e raramente infecção.

Confidencialidade e privacidade dos seus dados e identificação

A equipe do estudo colherá informações suas como nome, endereço, telefone de contato, data de nascimento, dados sobre sua saúde e história médica, além das informações verificadas durante o estudo. Ao apresentar os resultados da pesquisa em congressos ou publicações, a equipe nunca fará referência ao seu nome.

Posso me recusar a participar do estudo?

Sim. A sua participação neste estudo é voluntária. Se você decidir não participar, você não terá nenhum prejuízo do seu atendimento e tratamento médico aos quais tem direito.

Como poderei tirar dúvidas a respeito do estudo?

Em caso de dúvida entre em contato com os médicos que estão conduzindo o estudo, no ambulatório de obesidade do Gastrocentro da Unicamp, às quartas-feiras pela manhã, ou pelos telefones (19) 3521-7755 (Dra. Briana Rachid), 3521-8022 (Dr. Licio Velloso), ou 3521-8589 (Dra. Carolina de Souza ou Dr. Bruno Geloneze). Se tiver dúvidas sobre seus direitos como participante do estudo, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelo telefone (19) 3521-8936 ou e-mail cep@fcm.unicamp.br, endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 - Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP.

Você receberá uma cópia assinada deste termo de consentimento livre e esclarecido.

Eu li e compreendi este termo de consentimento. Todas as minhas dúvidas foram respondidas. Sou voluntário para participar deste estudo.

Nome do voluntário: _____

Assinatura: _____ **Data** ____ / ____ / ____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

VI. PERMISSÃO PARA REPRODUÇÃO DE ARTIGO

LICCENCE TO PUBLISH

nature publishing group

Manuscript No. 100

2015LID000363B

You must be:

International Journal of Obesity

1522 Journal of

Fractured Tilt of the Gently Slope

Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity

the "Contributor

doi:10.1017/S0022292412001616

[illegible]

Other "Austrians":

To: Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Ltd ("NPG")

- in consideration of NPG evaluating the Contribution for publication (and publishing the Contribution if NPG so decides) the Author(s) grant to NPG for the full term of copyright and any extensions thereto, subject to clause 2 below, the exclusive right and irrevocable license:
- (a) to edit, adapt, publish, republish, circulate, display and store the Contribution in all forms, formats and media whether now known or hereafter developed (including without limitation in print, digital and electronic form) throughout the world;
 - (b) to translate the Contribution into other languages, create adaptations, summaries or abstracts of the Contribution or other derivative works based on the Contribution and exercise all of the rights set forth in (a) above in such translations, adaptations, summaries, abstracts and derivative works;
 - (c) to license others to do any or all of the above;
 - (d) to re-license or re-use materials without restriction (including but not limited to author name, title, abstract, citation, references, keywords and any additional information, as determined by NPG);
2. Ownership of copyright remains with the Author(s), and provided that when reproducing the Contribution or extracts from it in the Supplementary Information on (as defined below), the Author(s) acknowledge first and foremost publication in the Journal, the Author(s) retain any of the following non-exclusive rights:
- (a) to reproduce the Contribution in whole or in part, in any printed volume (book or journal) of which they are the Authors;
 - (b) if they are an academic institution where their work may reproduce the Contribution for the purpose of course teaching;
 - (c) to post a copy of the Contribution as accepted for publication on their paper review (if a named work, pre-proof file, or a PDF version thereof) on the Author(s) own website, or institutional repositories, or the Author(s) funding agency archive six months after publication of the printed or online edition of the Journal, provided that they also link to the Contribution on NPG web site; and
 - (d) to reuse figures or tables created by the Author(s) and contained in the Contribution in other presentations and other works created by them.
3. The Author(s) grant to NPG for the full term of copyright any and all extensions thereto the same rights that have been granted in respect of the Contribution as set out in clause 1 above in and to all supplementary material in any form (including without limitation images, videos, tables and/or graphs) submitted by the Author(s) to NPG with or in connection with the Contribution ("Supplementary Information") but on a non-exclusive basis.
4. NPG acknowledges that no earlier version of the Contribution and/or Supplementary Information may have been submitted to a print service in accordance with that service's source and license terms).
5. The Author(s) warrant and represent that:
- (a) the Author(s) are the sole Author(s) of and sole owner(s) of the copyright in the Contribution and the Supplementary Information and the Contribution and the Supplementary Information is the original work of the Author(s) and not copied (in whole or part) from another work. If however the Contribution or the Supplementary Information includes materials from other sources, the Author(s) warrant they have obtained the necessary rights from the owners of the copyright in all such materials and hereby license to NPG here the use of such materials in accordance with the grant of rights in clause 1. Copies of all such grant of rights from third parties are attached to this license;
 - (b) all of the facts contained in the Contribution and the Supplementary Information are true and accurate;
 - (c) the signatory (the Author or the employer) who has signed this Agreement below has full right, power and authority to enter into this Agreement and grant the rights herein on behalf of all of the Author(s);
 - (d) nothing in the Contribution or the Supplementary Information is obscene, defamatory, libelous, violative any right of privacy or publicity, mimics any intellectual property rights (including without limitation copyright, patent, database or trademark rights) or any other human, personal or other rights of any person or entity or is otherwise unlawful; and
 - (e) nothing in the Contribution or the Supplementary Information mimics any duty of confidentiality which any of the Author(s) may owe to a third party or violates any contract, express or implied, of any of the Author(s), and all of the institutions in which work recorded in the Contribution or the Supplementary Information was created or carried out, have authorized such publication.
6. The Author(s) authorize NPG to take such steps as it considers necessary at its own expense in the Author's name and on their behalf if NPG believes that a third party is infringing or is likely to infringe copyright in the Contribution and/or Supplementary Information working but not limited to initiating legal proceedings.
7. The Author(s) grant NPG the perpetual right to edit, correct or retract the Contribution and Supplementary Information if NPG determines (in its reasonable opinion) that such actions are required. The Author(s) hereby agree that they shall not object to NPG carrying out any such actions.
8. The Author(s) shall cooperate fully with NPG in relation to any legal action that might arise from the publication of the Contribution and/or Supplementary Information and the Author(s) shall give NPG access at reasonable times to any relevant accounts, documents and records within the power or control of the Author(s).
9. If the Contribution is rejected by NPG and not published, all rights under this license shall revert to the Author(s).
10. This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of England and Wales. The parties irrevocably agree that the courts of England and Wales shall have exclusive jurisdiction to settle any dispute or claim that arises out of or in connection with this Agreement or its subject matter or enforcement.

Signed for and on behalf of the Author(s)

2000

Deter

Ans

Licia Augusta Velasco

May 10, 2015

Department of Internal Medicine, University of Campinas - 1308970 Campinas SP, Brazil

Does the Contribution and/or the Supplementary Information contain material from third parties (including previously published images/figures)?

Yes ☐ No ☒ If yes, please ensure copies of the grant of rights are submitted with this form as indicated in clause 3(a)

REFERÊNCIAS

1. Kopelman PG. Emerging management strategies for obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22 Suppl 1:S7-11; discussion S2, S42.
2. Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1821-30.
3. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45.
4. Baboota RK, Sarma SM, Boparai RK, Kondepudi KK, Mantri S, Bishnoi M. Microarray based gene expression analysis of murine brown and subcutaneous adipose tissue: significance with human. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127701.
5. Wang YC, McPherson K, Marsh T, Gortmaker SL, Brown M. Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *Lancet*. 2011;378(9793):815-25.
6. Cawley J, Rizzo JA, Haas K. Occupation-specific absenteeism costs associated with obesity and morbid obesity. *J Occup Environ Med*. 2007;49(12):1317-24.
7. Klemas N, Dowling R. Clinical Economics Obesity. *Med Econ*. 2015;92(4):22, 4-5.
8. Adams KT. Managing the high cost of obesity. *Manag Care*. 2015;24(1):42-4.
9. Cawley J. An economy of scales: A selective review of obesity's economic causes, consequences, and solutions. *J Health Econ*. 2015.
10. Buehler L, Fayfman M, Alexopoulos AS, Zhao L, Farrokhi F, Weaver J, et al. The impact of hyperglycemia and obesity on hospitalization costs and clinical outcome in general surgery patients. *J Diabetes Complications*. 2015.
11. Lyssenko V, Groop L. Genome-wide association study for type 2 diabetes: clinical applications. *Curr Opin Lipidol*. 2009;20(2):87-91.
12. Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev*. 2006;27(7):710-18.
13. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, et al. The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378(9793):804-14.
14. Jacobs DR, Jr. Fast food and sedentary lifestyle: a combination that leads to obesity. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(2):189-90.
15. Rivellese AA, Maffettone A, Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Berglund L, et al. Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and post-prandial lipid metabolism in healthy subjects. *Atherosclerosis*. 2003;167(1):149-58.
16. Middleton KM, Patidar SM, Perri MG. The impact of extended care on the long-term maintenance of weight loss: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2012;13(6):509-17.
17. Aronne LJ. Obesity as a disease: etiology, treatment, and management considerations for the obese patient. *Obes Res*. 2002;10 Suppl 2:95S-6S.
18. Yanovski SZ, Yanovski JA. Long-term drug treatment for obesity: a systematic and clinical review. *JAMA*. 2014;311(1):74-86.
19. Patel D. Pharmacotherapy for the management of obesity. *Metabolism*. 2015.
20. Pi-Sunyer X, Astrup A, Fujioka K, Greenway F, Halpern A, Krempf M, et al. A Randomized, Controlled Trial of 3.0 mg of Liraglutide in Weight Management. *N Engl J Med*. 2015;373(1):11-22.
21. Jensen MD, Ryan DH, Apovian CM, Ard JD, Comuzzie AG, Donato KA, et al. 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and The Obesity Society. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S102-38.

22. Ghotbi AA, Kober L, Finer N, James WP, Sharma AM, Caterson I, et al. Association of hypoglycemic treatment regimens with cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects with type 2 diabetes: a substudy of the SCOUT trial. *Diabetes Care*. 2013;36(11):3746-53.
23. Maggioni AP. SCOUT trial reports on the safety profile of sibutramine in patients with cardiovascular diseases. *Phys Sportsmed*. 2009;37(3):95-7.
24. James WP, Caterson ID, Coutinho W, Finer N, Van Gaal LF, Maggioni AP, et al. Effect of sibutramine on cardiovascular outcomes in overweight and obese subjects. *N Engl J Med*. 2010;363(10):905-17.
25. Greenway FL, Caruso MK. Safety of obesity drugs. *Expert Opin Drug Saf*. 2005;4(6):1083-95.
26. Greenway FL. Physiological adaptations to weight loss and factors favouring weight regain. *Int J Obes (Lond)*. 2015;39(8):1188-96.
27. Hainer V, Toplak H, Mitrakou A. Treatment modalities of obesity: what fits whom? *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S269-77.
28. Greenhill C. Obesity: Bariatric surgery-long-term effects. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(10):567.
29. Keating C, Neovius M, Sjoholm K, Peltonen M, Narbro K, Eriksson JK, et al. Health-care costs over 15 years after bariatric surgery for patients with different baseline glucose status: results from the Swedish Obese Subjects study. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015.
30. Sjostrom L, Peltonen M, Jacobson P, Ahlin S, Andersson-Assarsson J, Anveden A, et al. Association of bariatric surgery with long-term remission of type 2 diabetes and with microvascular and macrovascular complications. *JAMA*. 2014;311(22):2297-304.
31. Carlsson LM, Peltonen M, Ahlin S, Anveden A, Bouchard C, Carlsson B, et al. Bariatric surgery and prevention of type 2 diabetes in Swedish obese subjects. *N Engl J Med*. 2012;367(8):695-704.
32. Benetti A, Del Puppo M, Crosignani A, Veronelli A, Masci E, Frige F, et al. Cholesterol metabolism after bariatric surgery in grade 3 obesity: differences between malabsorptive and restrictive procedures. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1443-7.
33. Brethauer SA, Aminian A, Rosenthal RJ, Kirwan JP, Kashyap SR, Schauer PR. Bariatric surgery improves the metabolic profile of morbidly obese patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2014;37(3):e51-2.
34. Auguet T, Terra X, Hernandez M, Sabench F, Porras JA, Orellana-Gavalda JM, et al. Clinical and adipocytokine changes after bariatric surgery in morbidly obese women. *Obesity (Silver Spring)*. 2014;22(1):188-94.
35. Sjostrom L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med*. 2013;273(3):219-34.
36. Puzifferri N, Roshek TB, 3rd, Mayo HG, Gallagher R, Belle SH, Livingston EH. Long-term follow-up after bariatric surgery: a systematic review. *JAMA*. 2014;312(9):934-42.
37. Benaiges D, Sague M, Flores-Le Roux JA, Pedro-Botet J, Ramon JM, Villatoro M, et al. Predictors of Hypertension Remission and Recurrence After Bariatric Surgery. *Am J Hypertens*. 2015.
38. Schauer PR, Bhatt DL, Kirwan JP, Wolski K, Brethauer SA, Navaneethan SD, et al. Bariatric surgery versus intensive medical therapy for diabetes--3-year outcomes. *N Engl J Med*. 2014;370(21):2002-13.
39. Schmidt JB, Pedersen SD, Gregersen NT, Vestergaard L, Nielsen MS, Ritz C, et al. Effects of RYGB on energy expenditure, appetite and glycaemic control: a randomized controlled clinical trial. *Int J Obes (Lond)*. 2013.
40. Dirksen C, Jorgensen NB, Bojsen-Moller KN, Jacobsen SH, Hansen DL, Worm D, et al. Mechanisms of improved glycaemic control after Roux-en-Y gastric bypass. *Diabetologia*. 2012;55(7):1890-901.
41. Tremaroli V, Karlsson F, Werling M, Stahlman M, Kovatcheva-Datchary P, Olbers T, et al. Roux-en-Y Gastric Bypass and Vertical Banded Gastroplasty Induce Long-Term Changes on the Human Gut Microbiome Contributing to Fat Mass Regulation. *Cell Metab*. 2015;22(2):228-38.

42. Schmidt JB, Pedersen SD, Gregersen NT, Vestergaard L, Nielsen MS, Ritz C, et al. Effects of RYGB on energy expenditure, appetite and glycemic control: a randomized controlled clinical trial. *Int J Obes (Lond)*. 2015.
43. Svensson PA, Anveden A, Romeo S, Peltonen M, Ahlin S, Burza MA, et al. Alcohol consumption and alcohol problems after bariatric surgery in the Swedish obese subjects study. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(12):2444-51.
44. Scholtz S, Goldstone AP, le Roux CW. Changes in Reward after Gastric Bypass: the Advantages and Disadvantages. *Curr Atheroscler Rep*. 2015;17(10):61.
45. Araujo EP, Torsoni MA, Velloso LA. Hypothalamic inflammation and obesity. *Vitam Horm*. 2010;82:129-43.
46. Arruda AP, Milanski M, Coope A, Torsoni AS, Ropelle E, Carvalho DP, et al. Low-grade hypothalamic inflammation leads to defective thermogenesis, insulin resistance, and impaired insulin secretion. *Endocrinology*. 2011;152(4):1314-26.
47. Arruda AP, Milanski M, Velloso LA. Hypothalamic inflammation and thermogenesis: the brown adipose tissue connection. *J Bioenerg Biomembr*. 2011;43(1):53-8.
48. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S. The hormonal control of food intake. *Cell*. 2007;129(2):251-62.
49. Dorfman MD, Thaler JP. Hypothalamic inflammation and gliosis in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2015;22(5):325-30.
50. Morrison SF, Nakamura K. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:74-104.
51. Thaler JP, Guyenet SJ, Dorfman MD, Wisse BE, Schwartz MW. Hypothalamic inflammation: marker or mechanism of obesity pathogenesis? *Diabetes*. 2013;62(8):2629-34.
52. Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2012;122(1):153-62.
53. van de Sande-Lee S, Pereira FR, Cintra DE, Fernandes PT, Cardoso AR, Garlipp CR, et al. Partial reversibility of hypothalamic dysfunction and changes in brain activity after body mass reduction in obese subjects. *Diabetes*. 2011;60(6):1699-704.
54. van de Sande-Lee S, Velloso LA. [Hypothalamic dysfunction in obesity]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(6):341-50.
55. Velloso LA, Schwartz MW. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2011;35(12):1455-65.
56. Velloso LA, Torsoni MA, Araujo EP. Hypothalamic dysfunction in obesity. *Rev Neurosci*. 2009;20(5-6):441-9.
57. Woods SC, D'Alessio DA. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11 Suppl 1):S37-50.
58. Kennedy GC. The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1953;140(901):578-96.
59. Hervey GR. The effects of lesions in the hypothalamus in parabiotic rats. *J Physiol*. 1959;145(2):336-52.
60. Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*. 1950;41(12):317-8.
61. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994;372(6505):425-32.
62. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995;83(7):1263-71.
63. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med*. 1996;334(5):292-5.
64. Friedman JM. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *Am J Clin Nutr*. 2009;89(3):973S-9S.

65. Lee YS, Challis BG, Thompson DA, Yeo GS, Keogh JM, Madonna ME, et al. A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab.* 2006;3(2):135-40.
66. Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, la Fleur SE, Kas MJ, de Krom M. The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol.* 2006;149(7):815-27.
67. Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog Horm Res.* 2004;59:267-85.
68. Lin X, Taguchi A, Park S, Kushner JA, Li F, Li Y, et al. Dysregulation of insulin receptor substrate 2 in beta cells and brain causes obesity and diabetes. *J Clin Invest.* 2004;114(7):908-16.
69. Porte D, Jr., Baskin DG, Schwartz MW. Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes.* 2005;54(5):1264-76.
70. Schwartz MW. Central nervous system regulation of food intake. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14 Suppl 1:1S-8S.
71. Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology.* 2005;146(3):1576-87.
72. Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci.* 2009;29(2):359-70.
73. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell.* 2010;140(6):900-17.
74. Lehnardt S, Schott E, Trimbuch T, Laubisch D, Krueger C, Wulczyn G, et al. A vicious cycle involving release of heat shock protein 60 from injured cells and activation of toll-like receptor 4 mediates neurodegeneration in the CNS. *J Neurosci.* 2008;28(10):2320-31.
75. Wisse BE, Schwartz MW. Does hypothalamic inflammation cause obesity? *Cell Metab.* 2009;10(4):241-2.
76. Carnell S, Gibson C, Benson L, Ochner CN, Geliebter A. Neuroimaging and obesity: current knowledge and future directions. *Obes Rev.* 2012;13(1):43-56.
77. Tataranni PA, DelParigi A. Functional neuroimaging: a new generation of human brain studies in obesity research. *Obes Rev.* 2003;4(4):229-38.
78. Dimitropoulos A, Tkach J, Ho A, Kennedy J. Greater corticolimbic activation to high-calorie food cues after eating in obese vs. normal-weight adults. *Appetite.* 2012;58(1):303-12.
79. Bruce AS, Holsen LM, Chambers RJ, Martin LE, Brooks WM, Zarcone JR, et al. Obese children show hyperactivation to food pictures in brain networks linked to motivation, reward and cognitive control. *Int J Obes (Lond).* 2010;34(10):1494-500.
80. Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron.* 2011;69(4):664-79.
81. Grill HJ, Skibicka KP, Hayes MR. Imaging obesity: fMRI, food reward, and feeding. *Cell Metab.* 2007;6(6):423-5.
82. Stice E, Yokum S, Blum K, Bohon C. Weight gain is associated with reduced striatal response to palatable food. *J Neurosci.* 2010;30(39):13105-9.
83. Stice E, Yokum S, Bohon C, Marti N, Smolen A. Reward circuitry responsivity to food predicts future increases in body mass: moderating effects of DRD2 and DRD4. *Neuroimage.* 2010;50(4):1618-25.
84. Roman S, Agil A, Peran M, Alvaro-Galve E, Ruiz-Ojeda FJ, Fernandez-Vazquez G, et al. Brown adipose tissue and novel therapeutic approaches to treat metabolic disorders. *Transl Res.* 2015;165(4):464-79.
85. Nedergaard J, Cannon B. The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions. *Cell Metab.* 2010;11(4):268-72.
86. Dawkins MJ, Scopes JW. Non-shivering thermogenesis and brown adipose tissue in the human new-born infant. *Nature.* 1965;206(980):201-2.

87. Rothwell NJ, Stock MJ. Regulation of energy balance in two models of reversible obesity in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1979;93(6):1024-34.
88. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue thermogenesis in neonatal and cold-adapted animals. *Biochem Soc Trans.* 1986;14(2):233-6.
89. Heaton JM. The distribution of brown adipose tissue in the human. *J Anat.* 1972;112(Pt 1):35-9.
90. Huttunen P, Hirvonen J, Kinnula V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1981;46(4):339-45.
91. Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R, Niemi T, et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1518-25.
92. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1509-17.
93. van Marken Lichtenbelt WD, Vanhomerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, et al. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1500-8.
94. Hany TF, Gharehpapagh E, Kamel EM, Buck A, Himms-Hagen J, von Schulthess GK. Brown adipose tissue: a factor to consider in symmetrical tracer uptake in the neck and upper chest region. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2002;29(10):1393-8.
95. Cohade C, Osman M, Pannu HK, Wahl RL. Uptake in supraclavicular area fat ("USA-Fat"): description on 18F-FDG PET/CT. *J Nucl Med.* 2003;44(2):170-6.
96. Nedergaard J, Bengtsson T, Cannon B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(2):E444-52.
97. Yeung HW, Grewal RK, Gonen M, Schoder H, Larson SM. Patterns of (18)F-FDG uptake in adipose tissue and muscle: a potential source of false-positives for PET. *J Nucl Med.* 2003;44(11):1789-96.
98. Harms M, Seale P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. *Nat Med.* 2013;19(10):1252-63.
99. Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature.* 2008;454(7207):961-7.
100. Vitali A, Murano I, Zingaretti MC, Frontini A, Ricquier D, Cinti S. The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res.* 2012;53(4):619-29.
101. Wu J, Bostrom P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell.* 2012;150(2):366-76.
102. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine.* 2006;29(1):81-90.
103. Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2011;2:85.
104. Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004;84(1):277-359.
105. Kozak UC, Kopecky J, Teisinger J, Enerback S, Boyer B, Kozak LP. An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol Cell Biol.* 1994;14(1):59-67.
106. Enerback S. The origins of brown adipose tissue. *N Engl J Med.* 2009;360(19):2021-3.
107. Enerback S. Brown adipose tissue in humans. *Int J Obes (Lond).* 2010;34 Suppl 1:S43-6.
108. Seale P, Conroe HM, Estall J, Kajimura S, Frontini A, Ishibashi J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest.* 2011;121(1):96-105.
109. Seale P. Transcriptional Regulatory Circuits Controlling Brown Fat Development and Activation. *Diabetes.* 2015;64(7):2369-75.

110. Xue B, Rim JS, Hogan JC, Coulter AA, Koza RA, Kozak LP. Genetic variability affects the development of brown adipocytes in white fat but not in interscapular brown fat. *J Lipid Res.* 2007;48(1):41-51.
111. Sharp LZ, Shinoda K, Ohno H, Scheel DW, Tomoda E, Ruiz L, et al. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. *PLoS One.* 2012;7(11):e49452.
112. Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 2010;285(10):7153-64.
113. Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev.* 2013;27(3):234-50.
114. de Jong JM, Larsson O, Cannon B, Nedergaard J. A stringent validation of mouse adipose tissue identity markers. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;308(12):E1085-105.
115. Cypess AM, White AP, Vernochet C, Schulz TJ, Xue R, Sass CA, et al. Anatomical localization, gene expression profiling and functional characterization of adult human neck brown fat. *Nat Med.* 2013;19(5):635-9.
116. Morrison SF, Madden CJ, Tupone D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. *Cell Metab.* 2014;19(5):741-56.
117. Collins S, Cao W, Robidoux J. Learning new tricks from old dogs: beta-adrenergic receptors teach new lessons on firing up adipose tissue metabolism. *Mol Endocrinol.* 2004;18(9):2123-31.
118. Whittle AJ, Lopez M, Vidal-Puig A. Using brown adipose tissue to treat obesity - the central issue. *Trends Mol Med.* 2011;17(8):405-11.
119. Whittle A, Relat-Pardo J, Vidal-Puig A. Pharmacological strategies for targeting BAT thermogenesis. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(6):347-55.
120. Bonet ML, Oliver P, Palou A. Pharmacological and nutritional agents promoting browning of white adipose tissue. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1831(5):969-85.

